

Apoptose em timócitos de camundongos: influência dos estresses oxidativo e nitrosativo e da dexametasona.

Dissertação de Mestrado
apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina como pré-requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre
em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis
2001

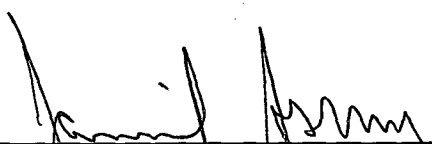
**“APOPTOSE EM TIMÓCITOS DE CAMUNDONGOS:
INFLUÊNCIA DOS ESTRESSES OXIDATIVO E NITROSATIVO
E DE GLICOCORTICÓIDES ”**

POR


RODRIGO QUINTANILHA VERAS

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



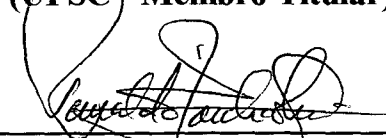
**Jamil Assreuy Filho(Orientador)
(FMC/UFSC - Membro Titular)**



**Marta Sampaio de Freitas
(UERJ – Membro Titular)**



**Hernan Terenzi
(UFSC - Membro Titular)**



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2001.

*"Wheels within wheels in a spiral array,
A pattern so grand and complex,
Time after time we lose sight of the way,
Our causes can't see their effects. "*

Natural Science/ Rush

Permanent Waves

Agradecimentos

Agradeço ao professor Jamil Assreuy Filho pela excelente orientação, oferecida durante todo decorrer do mestrado, e pelo exemplo de postura científica. Mas agradeço principalmente sua extraordinária paciência e a confiança depositada em mim em momentos muito difíceis da minha vida, sem as quais teria sido impossível prosseguir.

A Maria Cláudia Santos da Silva, pela amizade e inestimável ajuda em toda realização deste trabalho. Sem a sua habilidade e atenção, mesmo em momentos difíceis de sua vida, a conclusão desse trabalho teria sido impossibilitada.

A Márcia Ribeiro Terluk por sua preciosa amizade e paciência, tornando suportáveis situações muito complicadas deste período.

Aos amigos do laboratório: Renata S. Costa, José Eduardo Silva-Santos, Daniel Fernandez, Adriane S. Madeira, Danielle Duma, Emiliana, Rafael e Alexandre pela ótima convivência, apoio e por acabarem tornando-se pessoas muito importantes na minha vida.

Aos demais colegas da pós-graduação em Farmacologia, pelos exemplos de profissionalismo e companheirismo.

A minha ex-orientadora, professora Margherita Anna Barracco, responsável pelo começo da minha vida científica, pelo seu fundamental incentivo e amizade.

Aos amigos do GIQ e bar do Franck (inclusive o próprio): Fabio, Vidal, Paulo de Tarso, Wiggers e todos os outros, por serem tudo o que se espera de um amigo (e muito mais). Obrigado por ajudarem a manter minha sanidade (mesmo que talvez não fosse essa a intenção) e pela diversão nos últimos três anos.

A Maryualê Malvessi Mittmann por sua ajuda na fase final (e atribulada) da redação e formatação desse trabalho, mas principalmente por ser tudo aquilo que ela é.

Aos meus pais, Maria da Graça de Meneses Quintanilha Vêras e Francisco Fernando de Nazareth Pupo Quintanilha Vêras, por terem-me permitido chegar até aqui. Aos meus irmãos Fábio Quintanilha Vêras e Francisco Quintanilha Vêras Neto e à minha sobrinha Ana Gabriela Quintanilha Vêras, uma pequena amostra do futuro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	-corticotropina
ATP	- Trifosfato de adenosina
BCPS	- ácido dissulfônico baticuiproína
BIM	- bisindolilmaleimida
BPS	- ácido dissulfônico batofenantrolina
c/EBP	- proteína ligada a região reforçadora CAAT
CD4	- <i>Cluster of Diferenciation 4</i>
CD8	- <i>Cluster of Diferenciation 8</i>
cAMP	- Monofosfato de adenina cíclico
CREB	- Elemento de proteínas de ligação responsivas a cAMP
CRF	- Fator liberador de corticotropina
DAG	- Diacilglicerol
DTCs	- Diotiocarbamatos
DNA	- Ácido desoxiribnucleico (ADN)
DTT	- Ditiotreitól
EDRF	- Fator de relaxamento derivado do endotélio
EGF	- Fator de crescimento do endotélio
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
ERKs	- proteína quinase regulada por sinal extra celular
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
FADH2	- Dinucleotídeo flavina adenina reduzida
GDP	- Difosfato de guanosina
GPX	- Glutathione peroxidase
G NRF	- Fator liberador de nucleotídeos de Guanidina
GR	- Receptor de glicocorticóide
GTP	-Trifosfato de guanidina
HPA	- (eixo) hipotálamo-pituitária-adrenal
hsp90	- proteína de choque térmico com 90 kDa de peso molecular
I-CAM	- molécula de adesão celular
ICE	- enzima conversora da interleucina 1
IFN-β	- Interferon beta
IFN-δ	- Interferon gama
I-κB	- proteína inibitória kappa B
IL-1	- Interleucina 1
IL-2	- Interleucina 2
IL-2R	- Interleucina 2R
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
IP3	- Inositol - 1,4,5 trifosfato
JAK	- Janus Kinase
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTP	- potenciação de longa duração
MAPK	- Proteína Quinase ativadora de mitose
MEK	- Proteína Quinase ativadora de proteína quinase ativadora de mitose
MEKK	- MEK Kinase

MHC	- Complexo de histocompatibilidade principal
MTT	- Brometo de 4,5-dimetiazol-zil-2-5-difeniltetrazólo
NAC	- n-Acetil-cisteína
NADPH	- Dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato reduzida
NF-ATC	- Fator nuclear de células T ativas
NF-kB	- Fator nuclear Kappa B
NK	- Células <i>Natural Killers</i>
nNOS	- Óxido Nítrico sintase neuronal
NO	- Óxido Nítrico
EMSA	- Gel de mobilidade eletroforética
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDTC	- Ditio-carbamato de pirrolidina
PiP3K	- Inositol - 1,4,5 trifosfato proteína quinase
PKC	- Proteína Quinase C
PMA	- 12-O-tetradecanoil-forbol-13 acetato
RHD	- (<i>Rel Homology Domain</i>) Domínio de homologia Rei
RNA	- Ácido ribonucleico (ARN)
Ser	- Serina
STAT	- Ativador de Transcrição de transdução de sinal
SOD	- Superóxido dismutase
TBH4	- Tetra-hidro-biopterina
TCR	- Receptor de célula T
Thr	- Treonina
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
TNF- β	- Fator de necrose tumoral β
TUNEL	- <i>Terminal Deoxynucleotide Transferase-mediated dUTP-biotin Nick and Labelling</i>
Tyr	- Tiro-sina
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular
X-SCID	- Imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossomo X

RESUMO

Alterações no estado redox intracelular participam da modulação de diversos sistemas de sinalização entre os quais o da apoptose. No presente trabalho investigamos a influência do estresse oxidativo e nitrosativo na morte de timócitos de camundongo induzida por dexametasona, além de avaliar a participação da proteína quinase C (PKC) e do fator de transcrição NF- κ B na indução da apoptose nestas células.

Foram utilizadas culturas primárias de timócitos de camundongos Swiss-44 (4-7 semanas de idade). As células ($1 \times 10^6/0,2$ ml) foram incubadas (24 h) com dexametasona (1-100 nM), pirrolidina ditiocarbamato (PDTC; 1-100 nM, inibidor do NF- κ B), S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP; 100-1000 μ M, doador de NO), H_2O_2 (1-10 μ M), ditioneitol (DTT; 1-100 mM), bisindolilmaleimida (BIM; 1-100 μ M, inibidor da PKC) individualmente ou combinadas entre si. A viabilidade celular foi avaliada pela oxidação de um sal de tetrazólio (MTT). Todos os tratamentos foram capazes de induzir a morte celular por apoptose (verificada por microscopia de fluorescência) de forma significativa em relação aos controles. No entanto, nem o SNAP (um estímulo nitrosativo) nem a H_2O_2 (um estímulo oxidativo) foram capazes de bloquear (ou intensificar) a apoptose induzida por dexametasona. Na presença de PDTC, de DTT e de BIM também não houve mudança no efeito apoptótico induzido pela dexametasona. A combinação dos diversos tratamentos entre si não resultou em diferenças significativas com relação aos efeitos individuais de cada composto.

Nossos resultados não nos permitiram detectar qualquer sinergismo ou antagonismo entre os diversos tratamentos, sugerindo que as vias envolvidas na indução da apoptose em timócitos de camundongo sejam independentes. No entanto, não podemos descartar que essas diversas vias estejam interagindo de forma discreta, e que tais interações não possam ser detectadas pela metodologia empregada nesse estudo.

ABSTRACT

The complexity of intracellular signalling puzzles scientists since the first glimpses of these mechanisms were brought to light in the early fifties. The last 15 years were marked for remarkable advances in the comprehension of many molecular systems involved in signal transduction. The mainly targets of these investigations were the phosphorylation/dephosphorylation control systems. However, these last decades were also marked by achievements in other fields of biological science research. Indeed, the better understanding of the nitric oxide pathways and recognition of the importance of oxidative stress in cell proliferation and cell death, helped to achieve a deeper understanding of cell signalling. The ROS (reactive oxygen species) and RNS (reactive nitrogen species) can act as signalling molecules, for instance modifying some crucial residues of cysteine by oxidation or nitrosation. Therefore, the regulation of redox (and nitroergic) status of cells can be crucial for controlling cell differentiation, proliferation and cell death. In the present work we studied the role of nitrosative and oxidative stresses in dexamethasone-induced apoptosis in mouse thymocytes. For this, we used hydrogen peroxide (H_2O_2 ; 1-10 μM) as a oxidative stimulus, and SNAP (S-nitroso-acetyl-DL-penicillamine; 100-1000 μM), a NO donor as a nitrosative stimulus. In order to gain insight in the possible pathways involved in thymocyte apoptosis, we also used the inhibitor of NF- κB activation PDTC (pyrrolidine-dithiocarbamate; 1-100 nM), the antioxidant DTT (dithiothreitol; 1-100 μM) and BIM (bisindolylmaleimide; 1-100 μM), a protein kinase C inhibitor. The thymocytes were obtained from 3 or 7 weeks old female mice and kept in multiwell plates ($1 \times 10^6/0.2$ ml) for 24 hours, during the period of treatment. After that, cell survival were tested by the MTT method. All compounds (except DTT) induced cell death by apoptosis. Nevertheless, SNAP or H_2O_2 co-incubated with dexamethasone did not block or increase the apoptosis induced by dexamethasone alone. In the same line, dexamethasone-induced apoptosis was not affected by treatment with PDTC, DTT or BIM. In addition, the cell death effects of SNAP and H_2O_2 were not affected by these inhibitors.

These results suggest the existence of at least three different pathways to induce apoptosis in mouse thymocytes, namely the corticoid, the nitrosative and the oxidative pathways. The failure of inhibitors to affect apoptosis elicited by either dexamethasone, SNAP or H_2O_2 lead us to speculate that the mechanisms by which these compounds are inducing apoptosis may represent three independent pathways, although our data do not allow to completely rule out the possibility of discrete interactions between them.

ÍNDICE

1.	Introdução	1
1.1.	Origem dos seres multicelulares e a evolução dos sistemas de sinalização ..	2
1.2.	As vias de sinalização.....	5
1.2.1.	Sistemas de receptores e de sinalização intracelular	6
1.2.2.	Cascatas de fosforilação/defosforilação.....	7
1.2.2.1.	A via Ras.....	8
1.2.2.2.	A via MAPK.....	9
1.2.2.3.	A via JAK/STAT	11
1.2.3.	Fatores de Transcrição	12
1.2.3.1.	Controle e ativação	13
1.3.	Inflamação e Imunidade.....	17
1.3.1.	Papel do NF- κ B na inflamação e imunidade.....	18
1.4.	Apoptose.....	19
1.5.	Controle da maturação de linfócitos T.....	22
1.6.	Timo	23
1.7.	Maturação de linfócitos e Apoptose	24
1.8.	Estresse Oxidativo e Óxido Nítrico.....	28
1.8.1.	Estresse Oxidativo	28
1.8.2.	Óxido Nítrico	36
1.8.3.	Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN) e Sinalização Celular	39
1.8.3.1.	ERO e ERN na sinalização	40
1.8.3.2.	ERO e ERN e fatores de transcrição	42
1.8.3.3.	Mecanismos envolvidos no controle de sinalização via EROs e ERNs.	44
2.	Objetivos.....	46
2.1.	Objetivo geral	46
2.2.	Objetivos específicos	46
3.	Material e Métodos.....	47
3.1.	Animais	47
3.2.	Obtenção de Timócitos	47
3.3.	Protocolo Experimental	48
3.4.	Viabilidade Celular (Ensaio do MTT).....	49
3.5.	Microscopia de Fluorescência.....	49
3.6.	Análise Estatística.....	49
3.7.	Materiais e Reagentes	50
4.	Resultados.....	51
5.	Discussão	69
6.	Conclusões.....	85
7.	Referências Bibliográficas	87

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Todos os nossos processos fisiológicos dependem de um intenso tráfego de informações entre as trilhões de células que compõem nossos corpos. Os mecanismos de sinalização estão por trás dos processos de proliferação, crescimento, diferenciação e sobrevivência de todos organismos multicelulares. Portanto, não é de causar estranheza que um grande número de doenças envolvam alterações nos sistemas de sinalização, principalmente no seu nível mais fundamental, o da célula. A partir da década de 50 as primeiras pistas sobre a sinalização celular começaram a ser elucidadas. No entanto, foi nos últimos 15 anos que um estudo mais sistemático e profundo foi desenvolvido, ajudando a desvendar parte desta complexa rede de sinais celulares, lançando luz sobre uma série de questões há muito pendentes. Os avanços nesta área têm sugerido novas abordagens para velhos problemas, bem como novas e radicais estratégias terapêuticas para o controle de muitas doenças (Scott & Pawson, 2000).

Mais recentemente, duas novas linhas de pesquisa têm angariado crescente interesse no estudo da sinalização celular, que são o estudo do gás óxido nítrico (NO) e dos derivados do metabolismo oxidativo. Várias revisões têm ressaltado o papel do NO e de outros radicais livres em processos fisiológicos normais (Clerch e Massaro, 1997; Finkel, 1998; Allen & Tresini, 2000; Bogdan *et al.*, 2000) e na etiologia de uma série de doenças (Doria *et al.*, 1997; Akiyama *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000).

Cada vez é maior o número de vias de sinalização mostradas como sendo sensíveis à alteração do estado de oxi-redução das células, bem como à presença do óxido nítrico (NO) e seus derivados. O NO e as demais espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio parecem ter um papel importante no controle da proliferação, diferenciação e morte celular, participando desde os eventos iniciais de sinalização até a transcrição gênica. O entendimento do funcionamento desse complexo sistema e de como estas moléculas podem mediar esses processos se faz cada vez mais necessário.

1.1. Origem dos seres multicelulares e a evolução dos sistemas de sinalização

De acordo com o registro fóssil, as primeiras formas de vida surgiram provavelmente há pelo menos 4 bilhões de anos. As evidências mais antigas de vida bacteriana datam de 3,8 bilhões de anos atrás. No entanto, as chamadas formas de vida "complexas", os seres multicelulares, só devem ter aparecido 2 bilhões de anos depois (os fósseis mais antigos datam de 1,6-1,8 bilhões de anos; o que, se comparado à precoce origem da vida, pode ser considerado recente; Alberts *et al.*, 1994; Strickberger, 1996). Ainda mais recente é o aparecimento dos principais filos de metazoários, cerca de 545 milhões de anos atrás na chamada explosão Cambriana, inclusive com o surgimento dos ancestrais dos primeiros vertebrados. Ainda não se sabe o que levou ao aparecimento de seres multicelulares (Strickberger, 1996). Outra questão pendente é o porque de tanta demora em relação ao aparecimento da vida (Alberts *et al.*, 1994). Passaram-se bilhões de anos desde o aparecimento dos primeiros seres unicelulares até que as primeiras formas de organismos multicelulares evoluíssem. Talvez a dificuldade de coordenar, de forma precisa, as diversas células dos seres multicelulares possa ter sido o motivo para explicar esta demora. Tais organismos necessitam de um sistema de sinalização intercelular muito preciso, de tal forma que ao longo da ontogenia, suas

células possam determinar sua posição e papel específico naquele tecido (Alberts *et al.*, 1994; Wolpert, 1998; Lodish *et al.*, 2000). Alguns pesquisadores sugerem que a evolução de mecanismos de regulação do desenvolvimento e a maior oferta de O₂, e conseqüente surgimento do metabolismo aeróbio poderiam explicar o aparecimento de formas mais complexas de vida e justificar o enorme lapso de tempo necessário para este desenvolvimento (Strickberger, 1996). Pode-se especular que a evolução dos seres multicelulares tenha tido início quando grupos de células, ao invés de separarem-se, permaneceram associados formando pequenas colônias. Alguns eucariontes unicelulares guardam resquícios desse rudimento de "comportamento social" (Lodish *et al.*, 2000). Porém, o completo desenvolvimento ocorreu quando essas colônias passaram a se diferenciar em tipos celulares distintos e que dividiam suas funções. Cada tipo passou a executar uma função diversa e específica, complementar às demais, dando origem a um ser autônomo (Lodish *et al.*, 2000).

Como acontece freqüentemente na biologia, níveis organizacionais mais elevados acarretam custos extras. As células precisam ser capazes de dividirem-se apenas quando os sinais de sua vizinhança assim "ordenarem". A existência de processos de controle e sinalização são fundamentais para manter a identidade e integridade do organismo. Quando estes mecanismos de controle são subvertidos, ocorrem processos degenerativos e, dentre eles, o mais conhecido exemplo é o câncer (Alberts *et al.*, 1994; Weinberg, 1999; Lodish *et al.*, 2000).

Acredita-se que os sistemas de sinalização tenham tido sua origem nos seres unicelulares, que precisavam ser capazes de responder a estímulos externos, como alterações no seu meio ambiente (por exemplo, salinidade, nutrientes, luz, temperatura, etc.). As leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), e outros eucariontes

unicelulares, são capazes de responder a estímulos químicos de outros de sua própria espécie (Alberts *et al.*, 1994 e Lodish *et al.*, 2000). Um exemplo é o "fator de acasalamento", um peptídeo liberado por leveduras haplóides que age como um feromônio, sinalizando para que outra levedura (do "sexo" oposto") pare de proliferar e funda-se à primeira dando origem a uma célula diplóide que depois se divide. Outro exemplo importante de sinalização celular é organismos simples é encontrado no mixomiceto *Dictiosteliun discoieum*, que utiliza-se de um sistema de sinalização a base de cAMP, durante a passagem das formas amebóides de vida livre para a forma de plasmódium, formando uma massa sincicial semelhante a certos fungos(Alberts *et al.*, 1994 e Lodish *et al.*, 2000).

Uma das mais fundamentais características dos seres multicelulares é o arranjo espacial de seus tecidos e órgão, ou seja, a diferença está, principalmente, nas posições relativas das diferentes células, consequentemente dando origem aos diferentes tecidos e órgãos. Portanto, os processos de desenvolvimento e diferenciação tem que ser capazes de dar origem e manter, durante a vida adulta, toda esta fantástica organização (Strickberger, 1996). Lewis Wolpert chama de informação posicional as diferentes "pistas" que conferem às células a capacidade de diferenciar, migrar e proliferar no lugar e ocasião corretos (Wolpert, 1998). Algumas dessas pistas podem ser gradientes de substâncias morfogênicas (também conhecidas como *morfógenos*) e as próprias proteínas de matriz extracelular. A aquisição de tal informação depende invariavelmente da troca de sinais entre as células de um organismo (Strickberger, 1996; Wolpert, 1998).

1.2. As vias de sinalização

Os sinais que tornam possível a integração das células de um organismo, só se tornam "mensagens", adquirindo um "significado" apropriado, quando num certo contexto. Como qualquer sinal, estas mensagens precisam ser "interpretadas", o que depende das características de cada tecido e tipo celular. Assim, existe a necessidade de que as células traduzam e integrem-nas à sua própria rede de sinais intracelulares. Esse processo é normalmente conhecido como transdução de sinal. Como a transdução de sinal é o evento básico subjacente a como uma célula "interpreta" o *milieu* que a cerca e desencadeia uma resposta ao estímulo original, tornou-se fundamental compreender como se dá a regulação desses processos. Tal é a complexidade desse sistema que alguns sugerem que as células funcionariam como computadores, e que no seu interior operariam de forma análoga às chamadas redes neurais, processando "informações" de forma altamente paralela. Esses processos envolvem vários componentes, como receptores protéicos (extra e intracelulares), proteínas ligadas a GTP, proteínas quinases, fosfatases, além de diversos mediadores. A natureza dos mediadores que se ligam aos receptores intra e extracelulares varia muito. Podem ser proteínas, peptídeos, derivados de ácidos graxos, aminoácidos (e seus derivados), aminas, esteróides, retinóides, nucleotídeos e gases como o NO e o CO. A interação destas substâncias com os receptores desencadeia uma cascata de eventos intracelulares que podem alterar o crescimento, modificar o metabolismo e/ou o padrão de diferenciação da célula. Portanto, a compreensão de praticamente todos os processos fisiológicos dependem em maior ou menor grau do entendimento desses sistemas de sinalização (Alberts *et al.*, 1994 e Lodish *et al.*, 2000).

Três frentes de pesquisa originalmente independentes têm convergido nos últimos anos na tentativa de elucidar os sistemas de comunicação intracelular. São elas: i) o estudo dos mecanismos de transdução de sinal intracelulares; ii) as investigações sobre os efeitos do NO em sistemas biológicos e; iii) o estudo do estresse oxidativo e dos processos de formação de radicais livres. A princípio, buscou-se elucidar os passos iniciais das cascatas de transdução de sinal. O envolvimento dos receptores de membrana acoplados, ou não, a proteínas G, a participação das fosfolipases e canais iônicos e a subsequente formação de segundos mensageiros (e.g. IP₃, DAG, cAMP, cGMP, etc.) nesse processo. A ativação de cascatas de fosforilação e defosforilação, promovida pelas chamadas proteínas quinases e fosfatases, respectivamente, mostrou-se essencial na amplificação dos sinais externos, bem como e na efetivação das respostas promovidas por eles (Lodish *et al.*, 2000).

1.2.1. Sistemas de receptores e de sinalização intracelular

Os sinais provenientes das células podem agir diretamente sobre sua vizinhança imediata (sinalização parácrina), nelas próprias (autócrina), ou adentrarem na corrente sangüínea e atingir células alvo em tecidos muito distantes (endócrina); exatamente o que ocorre com a maioria dos hormônios. Alguns hormônios lipossolúveis (e.g. esteróides e retinóides) e alguns gases (NO e CO) difundem-se facilmente através da membrana e interagem com proteínas citoplasmáticas. As demais moléculas interagem com os receptores. Esses receptores são proteínas (geralmente formadas por várias subunidades) as quais atravessam a membrana lipídica. O ligante acopla-se a um sítio na porção extracelular e altera a conformação do receptor. É exatamente essa alteração que

promove o início dos eventos de transdução de sinal. Alguns desses receptores podem ser canais iônicos, em que a ligação da molécula sinalizadora modula sua abertura ou fechamento, causando alterações na concentração de íons e no potencial de membrana. Essas alterações podem induzir a abertura de outros canais (sensíveis à voltagem), amplificando a despolarização, (a exemplo de uma transmissão de um potencial de ação em um motoneurônio) (Alberts *et al.*, 1994). Ao mesmo tempo pode ativar proteínas Ca^{2+} dependentes, com a calmodulina, que se associam a outras proteínas modulando sua atividade. Outros tipos de receptores que não são canais iônicos, têm suas porções citoplasmáticas associadas a outras proteínas. O exemplo mais bem conhecido é o dos receptores acoplados à proteína G. A proteína G é formada por três subunidades (α , β e γ) e possui a capacidade de hidrolisar GTP em GDP. Ela é ativada pela alteração de conformação do receptor ao qual está acoplada, provocando a dissociação em suas subunidades. Essas, por sua vez, são capazes de ativar ou inativar outras enzimas ancoradas à membrana (adenilato ciclase, fosfolipase A2 e fosfolipase C). Pode ocorrer, então, a produção de moléculas (segundos mensageiros) capazes de difundirem-se pelo citosol ou pela membrana e ativar outras proteínas (Alberts *et al.*, 1994; Lodish *et al.*, 2000).

1.2.2. Cascatas de fosforilação/defosforilação

Geralmente a ativação desses eventos citoplasmáticos, característicos do começo da transdução de sinal, acabam por convergir nas chamadas cascatas de fosforilação (acréscimo de grupos fosfato a resíduos de tirosina, serina ou treonina, às custas da hidrólise de ATP; Alberts *et al.*, 1994; Lodish *et al.*, 2000). Estas cascatas consistem na ativação seqüencial de enzimas, cada qual ativando (ou inativando) outras quinases por fosforilação de certos resíduos de aminoácidos (Ser,

Thr ou Tyr). O controle desse processo se dá através da ação das fosfatases, que hidrolisam os grupos fosfato transferidos pelas quinases. Existem ainda outros tipos de receptores, que podem estar associados à proteínas quinases especiais, chamadas de tirosina quinases, ou que podem eles mesmos serem tirosinas quinases. No modelo arquetípico de receptores de citocinas (e.g. TNF- α e IFN- γ), a ativação do receptor ocorre quando, após o acoplamento do ligante, as duas subunidades do receptor unem-se formando um dímero, que se autofosforila. Esse modo de operar é comum a muitas células e pode ser observado na síntese e degradação do glicogênio no fígado e músculos, ativada por insulina, glucagon, adrenalina ou glicocorticóides. Outro exemplo clássico é ativação de receptores tirosina quinase por TNF- α . No entanto, esta forma de transdução de sinal é mais característica dos eventos que envolvem o controle da proliferação celular e apoptose.

1.2.2.1. A via Ras

Uma das mais bem conhecidas vias de sinalização intracelular é a via Ras, que tem esse nome devido a um de seus principais componentes, a proteína Ras, uma pequena proteína monomérica com atividade "GTPásica" (isto é, capaz de hidrolisar GTP em GDP). Apesar dos sinais de ativação serem diferentes, muitos dos eventos bioquímicos dessa cascata encontram-se conservados na escala evolutiva. Essa via já foi bem caracterizada no crescimento de células de mamíferos em cultura, no desenvolvimento dos olhos da mosca *Drosophila melanogaster*, na maturação da "vulva" do nematodo *C. elegans*, além de estar envolvida na resposta ao "fator de acasalamento", produzido pelo *S. cerevisiae* (Lewin, 1997). Em mamíferos a cascata tem origem com a ativação do receptor tirosina quinase (por

exemplo, receptores de PDGF e de EGF). A alteração de conformação resultante induz a ligação de proteínas à sua porção citoplasmática. No modelo clássico, uma proteína adaptadora, a Grb2, liga-se ao receptor fosforilado por meio do domínio SH2 (que possui afinidade por grupamentos com carga negativa, como resíduos de tirosina fosforilados; Scott & Pawson, 2000). Após acoplar-se ao receptor, a Grb2 liga-se à proteína SOS, que se move do citosol para a região da membrana nas vizinhanças da proteína Ras. Apenas essa proximidade parece ser suficiente para ativar a Ras. Acredita-se que isso se dê pela atividade GNRF (*Guanidine Nucleotide Release Factor*) da SOS sobre a Ras. A SOS é capaz de modificar a afinidade da Ras por GDP para GTP, o que a torna ativa. A própria atividade "GTPásica" da Ras encarrega-se de dar fim à essa ativação. O próximo passo é a ativação, pela Ras, da proteína Raf, uma serina/treonina proteína quinase, que acaba por fosforilar e ativar a MEK, originalmente conhecida como MAP (do inglês, *mitogen-activated kinase*) quinase quinase. A MEK é um ponto de convergência de muitos sinais, pois além de poder ser ativado pela via Ras, pode ser ativada pela MEKK (MEK quinase), uma proteína quinase ativada por proteínas G triméricas associadas a receptores do tipo serpentina (proteínas com sete domínios transmembranares; Lewin, 1997).

1.2.2.2. A via MAPK

A MEK é uma enzima com características particulares. Para ser ativada, ela precisa ser fosforilada pela Raf em resíduos de tirosina e treonina, o que não é muito comum (Lewin, 1997). Após ativada ela tem como únicos alvos as MAP quinases. As MAPK são serina/treonina proteínas quinases e dividem-se em três famílias, sendo que as mais conhecidas são as ERKs (do inglês, *Extracellular Signal Regulated Kinases*; Lewin, 1997).

A via da MAPK é uma das principais vias de transdução de sinal em células eucariontes, principalmente no que diz respeito à respostas inflamatórias e imunológicas. O recrutamento e migração de leucócitos, indução de "burst" oxidativo, expressão de moléculas de adesão e a degranulação acabam por envolver esta via, principalmente a que usa a isoforma p38 (Herlaar & Brown, 1999).

As MAPK iniciam eventos de fosforilação de outras serina/treonina proteínas quinase. Muitos estímulos podem ativar as MAPK, entre eles encontram-se fatores de crescimento e diferenciação (Lewin, 1997). Geralmente esses estímulos acabam por alterar o padrão de transcrição gênica (Lewin, 1997). No exemplo clássico é a própria MAPK que, após fosforilada, migra para o núcleo e ativa fatores de transcrição lá existentes. Em uma via alternativa a MAPK fosforila uma proteína no citoplasma. Após fosforilada, essa proteína migra para o núcleo, associando-se à seqüências específicas de seus genes alvos, induzindo (ou bloqueando) sua transcrição (Lewin, 1997). O exemplo mais conhecido é ativação das ERK1 e ERK2 pela MEK. Após ativada, a ERK1 permanece no citosol dando continuidade à cascata de fosforilação. Já a ERK2 migra para o núcleo e ativa alguns fatores de transcrição muito importantes, como o c-Myc e o ELK-1 (Lewin, 1997). A ativação das ERK (p42/44) está principalmente envolvida com proliferação, transformação e diferenciação (para revisão ver Herlaar & Brown, 1999). Outro fator importante, o c-Jun é ativado por uma outra MAPK, a Jun-quinase (p46/54; Lewin, 1997). Esta forma está envolvida principalmente em processos de apoptose, resposta ao estresse e à inflamação (vide Herlaar & Brown, 1999).

Os eventos da via Ras podem levar à uma amplificação do sinal original em aproximadamente 10 vezes por passo, o que no final da cascata poderia chegar a mais de 10.000 vezes de amplificação total (Lewin, 1997).

1.2.2.3. A via JAK/STAT

Outra via bastante importante ativada em resposta à estimulação de muitas citocinas é a chamada JAK/STAT. À semelhança da ativação da via anteriormente descrita, o evento inicial é a dimerização do receptor, que nesse caso em particular não tem atividade catalítica intrínseca. Na verdade, ao dimerizar-se, a mudança de conformação, resultante dessa dimerização, ativa duas proteínas tirosina quinases citosólicas, as JAK (do inglês, *Janus Kinases*), que se associam ao receptor ativo. Os alvos das JAK são fatores de transcrição chamados de STATS (do inglês, *Signal Transduction Activators of Transcription*), que uma vez fosforilados migram para o núcleo (geralmente associados a outras proteínas) e iniciam a transcrição de genes específicos (Lewin, 1997). São conhecidas até o momento 4 JAKs em mamíferos (JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2), originalmente identificadas em linhagens celulares mutantes que não respondiam a interferon. Apesar de JAKs específicas serem ativadas em resposta à estimulação de receptores específicos, as JAK quinases propriamente ditas não são em absoluto responsáveis pela especificidade de resposta das citocinas, já que muitas citocinas diferentes ativam as mesmas JAKs (vide revisão de Imada & Leonard, 2000). Na verdade, são os sistemas de transdução de sinal, acoplados as JAKs, os reais responsáveis pela especificidade de resposta. Estudos recentes, revisados em Imada e Leonard (2000), mostram que em camundongos nocaute para JAK 1 e 2 estas vias são muito importantes em diversos processos como a linfopoiese e eritropoiese. Mutações na JAK 3 em seres

humanos estão associadas à X-SCID (do inglês, *X-linked severe combined immunodeficiency*/ Imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossomo X). Camundongos nocaute para as diferentes STAT resultam em fenótipos característicos: a) deficiência na resposta imunológica contra vírus dependente de IFN (deficiente em STAT1); b) morte durante o desenvolvimento fetal (deficiente em STAT 3); c) proliferação linfocítica ausente (deficiente em STAT4) e não desenvolvimento de células NK (deficiente em STAT 5; vide revisão de Imada & Leonard, 2000).

1.2.3. Fatores de Transcrição

O chamado dogma central da biologia molecular diz que a informação hereditária, contida em todas as células, é transferida sempre do DNA para as proteínas. Isso significa que a informação genética contida no DNA é usada na produção de proteínas, essas sim as efetoras de todos os processos bioquímicos e celulares que dão origem a cada um de nós. No entanto, a informação contida no DNA primeiro dá origem a um intermediário, o RNA. Este, por sua vez, é usado como molde para a síntese de proteínas, que se dá através dos ribossomos. Este processo de formação dos chamados RNAs mensageiros, conhecido como transcrição gênica, é de fundamental importância no controle da expressão gênica. A falha desse processo resulta no invariável bloqueio de todos os eventos subsequentes (transporte para o citoplasma, processamento do RNA, tradução e eventos de alterações pós-traducionais; Latchman, 1998). O papel central da transcrição no controle da expressão gênica torna-a um ponto preferencial de controle. De fato, hoje se reconhece que, na grande maioria dos casos, quando uma proteína é expressa exclusivamente num tecido ou o é apenas após algum estímulo,

isso é feito por um processo que garante que apenas um determinado gene (ou grupo de genes) seja transcrito naquela situação em particular (Latchman, 1998). Os responsáveis por esse controle são conhecidos como fatores de transcrição, proteínas capazes de ligarem-se a determinadas regiões promotoras do DNA e associarem-se à maquinaria de transcrição (RNA polimerases e demais fatores de transcrição basal), induzindo a leitura do gene em questão e a síntese do RNA mensageiro (Latchman, 1998).

1.2.3.1. Controle e ativação

Apesar da grande diversidade de vias e moléculas envolvidas na transdução de sinal, existem alguns componentes que parecem ser extremamente conservados. Destaca-se o fator de transcrição NF- κ B, originalmente descrito em linfócitos B maduros como sendo responsável pela transcrição do gene da cadeia leve Kappa da imunoglobulina, de onde advém seu nome (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*). O NF- κ B, foi primeiramente descrito em 1986 (Baldwin e Sharp, 1987). Durante algum tempo, acreditava-se que ele fosse exclusivo de linfócitos B maduros, encontrado constitutivamente no núcleo, associado a uma sequência "reforçadora" presente em um dos íntrons do gene para cadeia Kappa. Na verdade, a crença de que o NF- κ B não era encontrado em nenhuma outra célula (inclusive células pré-B) provinha do fato de que o ensaio utilizado para sua detecção, o "gel-shifting", sempre falhava em encontrá-lo nos núcleos de qualquer outro tipo celular. Mais tarde, descobriu-se que isso ocorria porque o fator de transcrição, na grande maioria dos casos, encontrava-se no citoplasma associado a uma proteína inibitória, a I- κ B estando portanto inativo na maior parte do tempo. Não obstante, a ubiquidade do NF- κ B foi logo reconhecida

(para revisão vide Ghosh *et al.*, 1998). A importância dessa molécula ficou ainda mais evidente após a descoberta de seqüências de ligação do NF- κ B em regiões promotoras e “amplificadoras” de uma enorme gama de genes, revelando-se particularmente importante na indução de respostas ligadas, principalmente, à inflamação e à imunidade (Ghosh *et al.*, 1998). No entanto, existem outros exemplos em que o NF- κ B encontra-se constitutivamente ativo envolvendo linfócitos B maduros. A ativação constitutiva do NF- κ B parece participar da manutenção de fenótipos de várias células já diferenciadas (neurônios, células plasmáticas, macrófagos, etc.; Ghosh *et al.*, 1998).

O NF- κ B é um dímero formado por duas proteínas da família Rei. Cada membro dessa família possui uma região conservada de 300 aminoácidos chamada de RHD (do inglês, *Rel Homology Domain*). É nesta região que encontram-se os sítios responsáveis pela ligação ao DNA, associação ao I- κ B e dimerização. Nesta região também se encontra a seqüência de localização nuclear que, uma vez exposta, participa da translocação do fator do citoplasma para o núcleo (Ghosh *et al.*, 1998).

A primeira molécula a ser descrita era constituída pelas subunidades p50 e p65. Este heterodímero, às vezes, é referido como sendo o próprio NF- κ B. Na verdade, é apenas uma das muitas formas variantes desse fator. O NF- κ B pode ser considerado um arquétipo para os outros tipos de dímeros (Ghosh *et al.*, 1998).

A diversidade de combinações de monômeros freqüentemente confere grande especificidade ao reconhecimento de seqüências de DNA por cada variante. Isso ocorre porque as subunidades interagem umas com as outras na metade dos sítios de reconhecimento de seqüências de DNA, podendo então surgir diferenças

nas seqüências de aminoácidos expostas em cada heterodímero, o que pode resultar numa afinidade maior ou menor de cada dímero por uma seqüência de DNA em particular (Ghosh *et al.*, 1998). Além disso, existe diferença na capacidade de "transativação" de cada tipo de NF- κ B, ou seja, diferentes combinações podem ser mais ou menos eficientes em induzir a expressão de certos genes, provavelmente por interagirem de forma desigual com o complexo de transcrição basal e/ou outros fatores de transcrição.

A família Rel possui diversos membros. Entre eles: Dif, Dorsal, Relish (*Drosophila melanogaster*); v-Rel (oncogene encontrado em galináceos), c-Rel; p52 e Rel-B. O fator de transcrição NF-ATC (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T cells*) também possui um domínio homólogo ao RHD, sendo muitas vezes incluído como um membro da família das proteínas Rel (Ghosh *et al.*, 1998). Apesar da grande maioria dos NF- κ B estarem associados à ativação da transcrição gênica, certos dímeros podem funcionar como complexos de inativação ou repressão da transcrição de alguns genes. Desta forma, p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65 e p65/c-Rel são ativadores de transcrição enquanto que os homodímeros p50 e p52 são repressores de transcrição (Ghosh *et al.*, 1998). Como tanto o p52 quanto o p50 não possuem um domínio C-terminal variável, acredita-se que este domínio seja o responsável pela capacidade de transativação dos genes que respondem ao NF- κ B (Ghosh *et al.*, 1998).

Como já mencionado, a ativação do NF- κ B é regulada pelo inibidor citoplasmático I- κ B que se liga ao fator de transcrição, "mascarando" assim seu domínio de ligação com o DNA e a seqüência de localização nuclear, impedindo a translocação para o núcleo da célula. Da mesma forma que o NF- κ B, o I- κ B é

membro de uma vasta família de proteínas inibitórias que incluem I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ , I- κ B γ ; a BCL-2 em vertebrados superiores e a Cactus em *Drosophila* (Ghosh *et al.*, 1998). Todas possuem regiões múltiplas de homologia, chamadas de repetições de anquirina. Esses domínios são regiões de interação proteína-proteína. As interações específicas entre os domínios de anquirina e as regiões RHD parecem ser características de importância crucial, evolutivamente conservadas. Cada I- κ B difere no número de repetições de anquirina, aparentemente influenciando a especificidade com que cada I- κ B liga-se com os dímeros da família Rei. Algumas proteínas da família Rei, como o p105 e o p100 (da qual derivam a p50 e p52 por clivagem proteolítica limitada) também apresentam os domínios com repetições de anquirina, podendo ser classificados dentro da família das I- κ B.

Normalmente os heterodímeros e homodímeros do NF- κ B encontram-se, no citosol, complexados com proteínas inibitórias da família I- κ B e, nesta forma são incapazes de migrar para o núcleo e ligarem-se ao DNA. Os precursores de NF- κ B, p105 e p100 também encontram-se retidos no citoplasma, associados a outras proteínas da família Rei. Como essas proteínas possuem domínios anquirina, acredita-se que ao dobrarem-se, são capazes de mascarar seus próprios domínios RHD (de forma análoga ao I- κ B), bloqueando o sítio de ligação ao DNA e a sequência de localização nuclear. A ativação do fator de transcrição começa quando estímulos desencadeiam a ativação da I- κ B quinase. Esta, por sua vez, fosforila o I- κ B alterando sua afinidade pelo NF- κ B. Uma vez dissociado de seu inibidor, o NF- κ B migra para o núcleo onde se liga às sequências específicas de DNA, presentes nas regiões regulatórias de genes-alvo, modulando a transcrição dos mesmos. Enquanto

isso, o I- κ B dissociado do NF- κ B sofre ubiquitinação, que o marca para ser degradado pelo complexo proteassoma (Ghosh *et al.*, 1998).

1.3. Inflamação e Imunidade

As chamadas reações de imunidade e inflamação são características dos seres multicelulares. Respostas sistêmicas induzidas pela presença de parasitas, substâncias ou corpos estranhos, que acabaram tendo um efeito na sobrevivência das novas linhagens que surgiam e enfrentavam novos modos de vida (Millar e Ratcliffe, 1994).

Desde sua origem os novos seres passaram eles próprios a constituir nichos em potencial para os unicelulares, e até mesmo para outros multicelulares, numa associação convencionalmente chamada de parasitismo. A forma que a evolução parece ter encontrado foi o desenvolvimento de sistemas especializados na manutenção e recuperação da homeostasia do organismo, quando confrontado com parasitas. As respostas inflamatórias e as respostas imunológicas inatas são amplamente distribuídas na escala filogenética (Beck & Habicht, 1996). Invertebrados, vertebrados e mesmo as plantas encontraram meios bastante eficientes de lidar com parasitas. Todos os componentes dessas respostas têm em comum o fato de serem rápidas e pouco específicas, capazes de lidar com um amplo espectro de situações e parasitas (Beck & Habicht, 1996). Porém, a especialização e diversificação dos seres vivos deu origem a estratégias aparentemente mais eficientes a longo prazo, o que passou a ser muito importante para os vertebrados, com expectativas de vida maiores e, em contrapartida, taxas reprodutivas menores. A chamada resposta imune adaptativa, ou antecipatória, deve

ter surgido com os primeiros peixes mandibulados, há cerca de 400 milhões de anos (Beck & Habicht, 1996; Litman, 1996).

Uma das características da resposta imune de vertebrados, principalmente mamíferos, é a existência de células especializadas em reconhecer e combater uma fantástica variedade de parasitas e substâncias antigênicas. Outra característica fundamental é a memória imunológica. Essas características são particularmente evidentes em dois componentes celulares do sistema imune de vertebrados, os linfócitos B e T (Abbas *et al.*, 2000).

Ambos os tipos de linfócitos são capazes de reconhecer uma incrível variedade de motivos moleculares expressos por diversos agentes infecciosos. Os linfócitos B são os responsáveis diretos pela produção de anticorpos, enquanto os linfócitos T e seus diversos subtipos encontram-se envolvidos na integração da resposta imune de diversos tipos celulares ou na atividade citotóxica direta (Abbas *et al.*, 2000). As constantes alterações de fenótipos que os linfócitos sofrem durante toda a vida do indivíduo envolvem complexas vias de transdução de sinal. Mais uma vez, destacam-se as cascatas de fosforilação e controle da transcrição gênica. Algumas vias são bastante importantes nesses processos. As mais conhecidas são a vias Ras, MAPK e JAK/STAT, que geralmente culminam com a ativação de fatores de transcrição, tais como o NF- κ B.

1.3.1. Papel do NF- κ B na inflamação e imunidade.

Ghosh e colaboradores chamam a atenção para a ampla variedade de sinais, bem como para a natureza dos mesmos, capazes de ativar a via do NF- κ B (Ghosh *et al.*, 1998). O NF- κ B responde às citocinas (IL-1, TNF), produtos bacterianos (LPS)

e virais, radiação UV e intermediários de oxigênio, além de ionóforos de cálcio, esfingomielina, produtos da reciclagem de membrana e fragmentos de RNA em fita dupla (*double-stranded RNA*). A análise da grande maioria dos estímulos capazes de ativar o NF- κ B nos revela que, em sua grande maioria, estão relacionados com processos inflamatórios e de imunidade (Ghosh *et al.*, 1998). Além disso, a expressão de diversas citocinas (IL-1; IL-2; IL-2R; IL-6; IL-8; G-CSF; GM-CSF; TNF- α , TNF- β e IFN- β) são reguladas pelo NF- κ B. Além das citocinas, uma ampla variedade de proteínas de importância crítica em vários aspectos fisiopatológicos tem sua síntese regulada pelo NF- κ B: a) várias moléculas de adesão envolvidas na migração (VCAM-1, ELAM-1, I-CAM) de leucócitos e b) proteínas de fase aguda (angiotensina, proteína amilóide sérica, fator C3 do complemento, glicoproteína ácida α -1). Em recente revisão, Foo & Nolan (1999) citam o NF- κ B como fator de transcrição paradigmático (modelo) no que se refere a mecanismos moleculares para respostas imunológicas rápidas. É também importante ressaltar que o NF- κ B também é capaz de modular a expressão de proteínas da família Rei e I- κ B (I- κ B alfa, p105 e c-Rel), portanto, indiretamente modulando sua própria regulação (Ghosh *et al.*, 1998).

1.4. Apoptose

A integridade de um organismo depende do controle da proliferação e do crescimento celular. Caso não exista um rígido controle, facilmente qualquer crescimento celular terminaria na formação de uma massa tumoral (Lodish *et al.*, 2000). Pesquisas realizadas nos últimos anos mostraram que uma das principais formas de controle da proliferação celular é a chamada morte celular programada ou

apoptose. É bem conhecido que durante a morfogênese e embriogênese, células excedentes são descartadas durante o processo de formação de um órgão ou estrutura. O exemplo mais característico é a formação dos dedos em vertebrados. Neste caso, as células daquilo que vão tornar-se os espaços interdigitais estão destinadas a morrer para dar origem aos dedos (Lodish *et al.*, 2000). Outro exemplo característico é o desenvolvimento do cérebro, em que cerca de 60% das células originais morrem durante o amadurecimento e formação dessa estrutura. Além disso, diversos tecidos precisam constantemente reorganizar-se. Um exemplo claro é o epitélio intestinal, que é constantemente renovado (a cada 3 dias) e as células do sistema imune que precisam estar sempre tendo seu crescimento, diferenciação e sobrevivência controlada de uma forma muito precisa (Lodish *et al.*, 2000).

Como dito, este processo de morte celular programada é denominado de apoptose (palavra de origem grega utilizada para indicar as folhas que “morrem” por senescência durante o outono), termo criado por Kerr em 1976 (para revisão ver Brüne *et al.*, 1998 e Lodish *et al.*, 2000). Este tipo de morte celular é caracterizada por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas muito específicas. Durante a apoptose ocorre condensação do núcleo da célula e fragmentação do DNA em um padrão característico: quando submetido à eletroforese, os fragmentos de DNA dos núcleos de células apoptóticas formam um padrão semelhante à uma escada. A célula como um todo “murcha” e sua membrana sofre diversas alterações, dentre elas a formação dos chamados “blebs” (como se fossem bolhas), exposição de resíduos de fosfatidilserina (e outros antígenos de superfície) e, por fim, à formação e liberação dos chamados corpos apoptóticos (vesículas de membrana repletas de conteúdo citoplasmático e fragmentos de núcleo) que são prontamente eliminados

por macrófagos e outras células fagocíticas. Ao contrário da necrose, onde a célula “incha” e termina por virtualmente “explodir”, liberando seu conteúdo citoplasmático, a apoptose não desencadeia uma resposta inflamatória, sendo normalmente referida como uma morte “silenciosa” (Lodish *et al.*, 2000).

Apenas na presença de sinais específicos é que o programa apoptótico é ativado. Esse sinal pode ser a ausência de um fator de crescimento presente no soro, ou a ligação de um “sinal de morte”, como o que ocorre na ativação do receptor Fas, por um ligante Fas (*Fas ligand*). A apoptose também pode ser desencadeada por um sinal interno. Durante o processo de replicação do DNA, se acontecerem muitos erros e danos a esta macromolécula e não for possível repará-los, a célula pode iniciar o programa de apoptose. O aparecimento de muitos tipos de câncer bem como muitos tratamentos contra ele envolvem interferências no controle da apoptose (Alberts *et al.*, 1994; Weinberg, 1999; Lodish *et al.*, 2000). Outro promotor da apoptose pode ser a liberação, pelas mitocôndrias, do citocromo c resultante da chamada transição de permeabilidade de membrana, que pode ativar as caspases, os executores da apoptose (para revisão ver Kannan & Jain, 2000 e Saraste & Pulkki, 2000).

As caspases têm um papel preponderante na apoptose. Elas são cisteíno-proteases, homólogas à enzima ICE (do inglês, *Interleukin-1 converting enzyme*), com especial afinidade por ligações peptídicas que se seguem a partir do aminoácido aspartato. Esse processo chamado de proteólise limitada, onde diversas enzimas presentes em sua forma inativa (de zimogênio) são ativadas em cascatas proteolíticas, é fundamental para o processo de apoptose. Normalmente a apoptose é dividida em duas fases. A primeira fase é a de iniciação onde os alvos das

caspases são, principalmente, outras caspases e a segunda, a fase de execução, onde as caspases e outras enzimas ativadas na primeira fase promovem a destruição de diversas outras enzimas, de proteínas do citoesqueleto e do DNA. Até o momento foram identificadas 13 diferentes caspases (para revisão ver Stennicke e Salvasen, 1998 e 2000).

O descobrimento de genes supressores de tumores envolvidos na apoptose, e de suas variantes mutadas, abriu novas perspectivas no estudo, diagnóstico e no tratamento do câncer (Lodish *et al.*, 2000).

1.5. Controle da maturação de linfócitos T

Os linfócitos são as únicas células do organismo que expressam uma alta diversidade de receptores antigênicos capazes de reconhecer uma ampla variedade de “substâncias” estranhas. Essa diversidade é gerada durante o desenvolvimento dos linfócitos T e B a partir de células precursoras, originalmente incapazes de reconhecer ou responder a esses antígenos, uma vez que não expressam os receptores necessários. Esse processo é conhecido como maturação de linfócitos. Durante este processo, um rígido e controlado programa de expressão gênica tem lugar, que leva a uma gradativa mudança do fenótipo das células. À isso segue-se a diversificação do repertório de receptores, aquisição de competência funcional e, por fim, os linfócitos imaturos passam por um processo de seleção. É através desse processo que é garantido que os linfócitos reconheçam e respondam aos antígenos exógenos (não próprios) e tolerem os auto-antígenos (próprios; Abbas *et al.*, 2000).

1.6. Timo

O timo é um órgão de dois lobos situado no mediastino anterior. Cada lobo é dividido em vários lóbulos, separados uns dos outros por um septo fibroso. Cada lóbulo é dividido em uma camada externa cortical e uma interna medular. O córtex contém uma grande população de linfócitos T, o que não acontece com a medula, mais esparsamente povoada. Espalhada pelo timo existe um epitélio não linfóide abundante em citoplasma, além de outras células derivadas da medula óssea, como macrófagos e células dendríticas. Algumas dessas células dendríticas são derivadas de precursores de linfócitos e denominadas células dendríticas linfóides, diferentemente daquelas derivadas a partir dos mesmos precursores de células mielóides. No timo são abundantes estruturas denominadas corpúsculos de Hassall, que se constituem de conjuntos extremamente coesos de células epiteliais, provavelmente remanescentes de células degeneradas. O timo conta com um abundante suprimento de vasos sangüíneos e um amplo sistema de vasos linfáticos eferentes, que drenam em direção aos linfonodos do mediastino. O timo é derivado do ectoderma da região cervical e torácica do embrião (de estruturas chamadas fendas branquiais). A estruturação do timo não depende diretamente das células hematopoiéticas, mas sim das células epiteliais (Abbas *et al.*, 2000). O timo desempenha um papel importantíssimo na produção de linfócitos T. Células progenitoras multipotentes ("stem cells") provenientes da medula óssea entram no timo a partir da circulação sangüínea (Cotter & Martin, 1996; Abbas *et al.*, 2000). Uma vez lá, recebem uma série de sinais químicos que induzem: i) sua proliferação e crescimento; ii) o rearranjo dos genes que codificam os receptores de linfócitos T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*); iii) seleção de um repertório particular de TCR e,

por fim iv) sua diferenciação em um linfócito T maduro tolerante à auto-antígenos (Cotter e Martin, 1996). Normalmente, as células recém chegadas vindas dos vasos sangüíneos encontram-se no córtex e depois migram para a medula, onde se encontram células mais diferenciadas (Cotter & Martin, 1996; Abbas *et al.*, 2000).

1.7. Maturação de linfócitos e Apoptose

Cerca de 98% das células T do timo recém diferenciados (os timócitos) acabam por morrer sem conseguirem tornar-se linfócitos maduros e funcionais. A grande incidência de morte celular deve-se provavelmente à intensa seleção sofrida por todas essas células durante seu processo de amadurecimento, que ocorre ao longo de diversas etapas.

No início da "timopoiese" as células ainda não expressam os marcadores característicos de linfócitos, os antígenos de superfície CD4 e CD8, comumente chamadas de CD4⁻/CD8⁻ ou "Duplo negativas" (DN). O processo de maturação inicia-se quando ocorre o rearranjo bem sucedido dos genes para cadeia β dos timócitos. Em seguida ocorre a expressão de um complexo pre-TCR, formado pelo antígeno CD3, por uma cadeia β completamente rearranjada e por uma cadeia α não rearranjada. Esse complexo é capaz de transmitir um sinal que torna o timócito (CD4⁻/CD8⁻) apto a passar para fase seguinte, a de "Duplo Positivo" (DP), onde ele passa a expressar os dois antígenos característicos CD4⁺ e CD8⁺ (CD4⁺/CD8⁺). A falha no processo de rearranjo e conseqüente incapacidade de expressar o complexo pre-TCR, resulta no bloqueio do desenvolvimento e, eventualmente, na morte da célula em questão. Após essa primeira etapa, os timócitos CD4⁺/CD8⁺ expressam um repertório aleatório e particular de TCR. O destino dessas células é dado pela sua capacidade de interagir com o complexo principal de

histocompatibilidade, o MHC (do inglês, "Major Histocompatibility Complex") do organismo, expresso localmente pelas células epiteliais presentes no timo. Todas as células com repertórios de TCR incapazes de interagir com o MHC estão destinadas à morte, bem como aquelas que interagem com o MHC com alta afinidade, formando complexos MHC-TCR muito estáveis. Portanto, apenas aquelas que interagem fracamente ou moderadamente são "resgatadas" da morte celular (Cotter & Martin, 1996; Abbas *et al.*, 2000). Aquelas células que não reconhecem o MHC morrem num processo chamado de negligência, e aquelas que interagem fortemente morrem num outro processo chamado de seleção negativa (Cotter & Martin, 1996; Abbas *et al.*, 2000). Estudos realizados utilizando-se da metodologia de TUNEL (do inglês, *Terminal Deoxynucleotide Transferase-mediated dUTP-biotin Nick and Labelling*) que permite a detecção de padrões de fragmentação de DNA, indicam que tais mortes ocorrem por apoptose, uma vez que tais padrões são característicos da morte celular programada. Populações especiais de macrófagos distribuídas pelo timo encarregam-se de eliminar rapidamente os resquícios da apoptose, sendo bastante reduzido o número de células apoptóticas "visíveis" no timo (Cotter & Martin, 1996).

A parte final do processo de maturação ocorre através da chamada seleção positiva, em que aquelas células que escaparam da morte na etapa anterior recebem sinais que as levam a aumentar a expressão do complexo TCR, a expressar o CD69 (um novo marcador característico de linfócitos maduros) e sub-expressar um dos antígenos, CD4 ou o CD8, transformando-se em células "simples positivas" (SP; CD4⁺ ou CD8⁺), que migram para a periferia (Cotter & Martin, 1996; Abbas *et al.*, 2000).

O controle da apoptose no timo depende de uma intrincada miríade de sinais, que se entrecruzam nos timócitos, a partir da coestimulação do complexo TCR e dos receptores associados, podendo envolver várias vias de sinalização ao mesmo tempo. As mais bem conhecidas foram estudadas usando-se inibidores dos diversos passos de transdução de sinal e, portanto, não é de se espantar que existam ainda grandes lacunas no entendimento dos mecanismos envolvidos com a morte celular no timo (Cotter & Martin, 1996). Acredita-se que nesse a estimulação do complexo TCR deva envolver a formação de IP3 e DAG, que por sua vez ativam a PKC e a liberação de Ca^{2+} , uma vez que inibidores desses passos tendem a reverter a apoptose. Aparentemente, a ativação dessas vias termina na ativação de Ras e conseqüentemente da via da MAPK. Não obstante, a liberação de Ca^{2+} intracelular e a ativação da calcineurina podem ativar o fator de transcrição NF-AT, liberando-o para deslocar-se para o núcleo e modular a expressão de genes envolvidos no processo de morte celular (Cotter & Martin, 1996). Além da apoptose induzida por apresentação de antígeno, os timócitos também podem ser alvo de um processo menos específico de indução da apoptose via glicocorticóides. Este processo parece estar mais envolvido com respostas mais gerais à fenômenos de estresse, envolvendo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Diversos estímulos (como processos infecciosos), podem induzir a ativação desse eixo, que começa pela liberação do fator liberador de corticotropina (CRF) pelo hipotálamo que, por sua vez, induz a hipófise anterior a liberar ACTH, que atinge a circulação sangüínea e estimula a adrenal a produzir corticóides (para revisão ver Thompson, 1999 e Newton, 2000). Os efeitos dos glicocorticóides vão depender, além do tipo celular, do estado de diferenciação e do meio extracelular (e de qualquer outro fator,

porventura ali presente; Thompson, 1999). O papel de glicocorticóides na apoptose de células linfocíticas é bastante estudado. Acredita-se que diferentes subpopulações tenham diferentes sensibilidades à apoptose induzida por glicocorticóides (para revisão ver Thompson, 1999). Apesar de muitos dos mecanismos ainda não terem sido elucidados, sabe-se que estão envolvidos os fatores de transcrição NF- κ B e AP1, a via da MAPK além de, é claro, do receptor para glicocorticóide (GR), este último tido como essencial na indução de apoptose por glicocorticóides. Muitos experimentos com vários tipos de células em cultura têm indicado que a perda da função do GR previne a indução de apoptose por glicocorticóide (Thompson, 1999 e Newton, 2000).

O RG encontra-se, na sua forma inativa, associado à proteína hsp90 (*heat shock protein* com 90 kDa de peso molecular). A ligação do glicocorticóide desestabiliza o complexo GR/hsp90 provocando a liberação do receptor que, por sua vez, migra para o núcleo. A visão clássica é de que o GR associa-se à uma sequência do DNA que responde a glicocorticóides, tendo início assim a transcrição de genes envolvidos com apoptose. Uma vez no núcleo, o GR pode associar-se a co-ativadores, co-repressores e complexos modificadores do estado da cromatina e do padrão de acetilação das histonas (Thompson, 1999 e Newton, 2000). Alguns autores sugerem que os corticóides funcionem recrutando tais co-ativadores e enzimas modificadoras de histonas para as regiões regulatórias de genes. Além disso o GR pode interagir com vários outros fatores de transcrição, tais como o CREB (do inglês, *cAMP-responsive-element binding proteins*), c/EBP (*CAAT-enhancer binding protein*) e c-Jun. Em algumas situações tais interações não parecem depender da ligação do RG ao DNA, ainda que tal interação dependa do

sítio de ligação ao DNA presente no RG. No entanto, atualmente essa visão parece ter-se tornado muito simplista. Ao que tudo indica, muitas das funções dos glicocorticóides não podem ser atribuídas de forma exclusiva à sua ação direta na transcrição gênica, mesmo porque os GR interagem com vários outros alvos além do DNA. Sabe-se, por exemplo, que o GR pode interagir através de ligação proteína-proteína com o NF- κ B (para revisão ver Delfino & Walker, 1999; Thompson, 1999 e Newton, 2000).

1.8. Estresse Oxidativo e Óxido Nítrico

Ao mesmo tempo que se estudava os mecanismos de sinalização e controle da proliferação e sobrevivência das células, duas outras linhas de pesquisa desenvolviam-se paralelamente com objetivos um tanto diferentes, porém complementares: i) o estudo do chamado estresse oxidativo nos seres vivos e ii) o estudo dos fatores envolvidos no controle do tônus vascular e pressão arterial, que conduziu à descoberta de uma versátil molécula, o NO.

1.8.1. Estresse Oxidativo

Com exceção dos seres especializados em viver em condições anaeróbias, a grande maioria dos seres vivos dependem do O₂ para a produção de energia (Halliwell & Gutteridge, 1989). O oxigênio em sua forma livre deve ter surgido como um contaminante há cerca de 2 bilhões de anos, provavelmente a partir da evolução de organismos fotossintéticos que usavam H₂O como o doador de elétrons (Halliwell & Gutteridge, 1989). Por sua alta afinidade para elétrons, o oxigênio acabou por tornar-se o acceptor final de elétrons ideal para aqueles seres que passaram usar essas moléculas em suas reações metabólicas. A capacidade de receber elétrons

torna o oxigênio molecular capaz de gerar uma força termodinâmica grande o suficiente para fosforilação oxidativa (Stryer, 1995). A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o ATP é formado como resultado da transferência de elétrons do NADH e FADH₂ (oriundos do ciclo de Krebs) para o oxigênio, por uma série de carreadores (Stryer, 1995), sendo a principal fonte de energia dos seres aeróbios (Stryer, 1995). No entanto, esta mesma molécula essencial para a sobrevivência da imensa maioria dos animais e plantas é, em contrapartida, um elemento extremamente perigoso. Esta situação é muitas vezes referida como o paradoxo do O₂ (Davies e Ursini, 1995).

O O₂ pode ser tóxico, principalmente em altas concentrações e em altas pressões. Alguns estudos demonstravam a capacidade do O₂ inibir diretamente algumas enzimas (para maiores detalhes ver Halliwell & Gutteridge, 1989). No entanto, boa parte do efeito deletério do oxigênio provavelmente se dá pela formação de intermediários tóxicos durante o metabolismo oxidativo, os chamados radicais livres de oxigênio e outras espécies reativas de O₂ (ERO; Halliwell & Gutteridge, 1989).

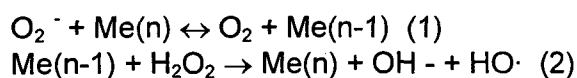
Durante o metabolismo aeróbico, elétrons são transferidos para uma molécula de oxigênio formando H₂O. De acordo com a hipótese quimiosmótica, essa transferência de elétrons está acoplada ao bombeamento de H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (Alberts *et al.*, 1994; Stryer, 1995; Lodish *et al.*, 2000). O desenvolvimento desse processo também permitiu que o oxigênio fosse utilizado para aumentar o rendimento (em relação ao metabolismo anaeróbico) da produção de energia nos seres vivos (Strickberger, 1996).

Normalmente os intermediários de oxigênio não são liberados, pois os elétrons encontram-se ligados ao Fe^{2+} e ao Cu^{2+} presentes nos grupos prostéticos das enzimas do complexo citocromo oxidase. Esses elétrons só são liberados para a formação de água (Stryer, 1995). Mesmo assim, uma pequena fração desses intermediários escapa e eles acabam sendo liberados (Halliwell & Gutteridge, 1989). Tais espécies são normalmente neutralizadas com ajuda de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e a catalase (Halliwell & Gutteridge, 1989; Lodish *et al.*, 2000) ou por antioxidantes não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C) e vitamina E (Halliwell & Gutteridge, 1989). A localização das enzimas antioxidantes geralmente contribui para manutenção de uma concentração relativamente estável das espécies reativas nos diversos compartimentos da célula (Halliwell & Gutteridge, 1989). Por exemplo, a Mn-SOD localiza-se na matriz mitocondrial e a Cu-Zn SOD no citosol. Outra fonte bastante importante de detoxificação é o peroxisomo (principal organela onde localiza-se a catalase; Lodish *et al.*, 2000). Mais recentemente também foram encontradas outras enzimas nessa mesma organela, como a SOD e glutathione peroxidase (para revisão Clerch & Massaro, 1997), sugerindo um papel ainda mais importante na manutenção do equilíbrio de oxi-redução nas células de mamíferos (Clerch & Massaro, 1997).

Por definição, radicais livres são aquelas moléculas que possuem elétrons desemparelhados em seus orbitais. Alguns exemplos são o radical hidroxil (OH^\bullet), o ânion superóxido (O_2^-) e o próprio oxigênio molecular. Outras espécies como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) não possuem elétrons desemparelhados mas, são capazes de reagir e lesar tecidos (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Apesar da produção mitocondrial de O_2^- e H_2O_2 ser extremamente importante, existem muitas outras fontes desses metabólitos extremamente reativos, principalmente de origem ambiental e do metabolismo de xenobióticos. O sistema microssomal de transferência de elétrons é um bom exemplo. Os ciclos de oxirredução levados a cabo pelo sistema de oxidases de função mista, composto pelas enzimas do citocromo P450 e NADPH citocromo redutases b5, são fontes muito importantes dessas espécies, principalmente do O_2^- (Lewis, 1996; Clerch & Massaro, 1997). Particularmente importante em situações patológicas conhecidas como isquemia/ reperfusão é a enzima xantina oxidase, que participa do metabolismo de nucleotídeos (Thomas & Kaiyanaraman, 1997). Podem também ser citadas como fontes adicionais de O_2^- a aldeído oxidase, a monoamina oxidase (presentes principalmente nas mitocôndrias), a acilCoA oxidase, a urato oxidase e a L-gulonactona oxidase NADPH oxidase (Halliwell & Gutteridge, 1989; Lewis, 1996; Clerch & Massaro, 1997). Outra enzima, a NADPH oxidase (na verdade um complexo multienzimático) presente em células fagocíticas constitui uma importante fonte de EROs durante as respostas inflamatória e imune (Clerch & Massaro, 1997). Outros processos físico-químicos, como a exposição a radiação eletromagnética de alta frequência, as chamadas radiações ionizantes (como por exemplo, os raios X e γ) são fontes de EROs (Halliwell & Gutteridge, 1989; Clerch & Massaro, 1997). Como a maior parte do tecido vivo é formado por água, tais radiações de alta frequência são capazes de remover elétrons presentes na água (daí o nome ionizantes), formando principalmente OH^\bullet (Clerch & Massaro, 1997). Outros processos, como a emissão de ultra-som, congelamento e liofilização também podem gerar tais compostos reativos (Clerch & Massaro, 1997). Levando em consideração a

diversidade das fontes de O_2^- , estima-se que cerca de 5% do O_2 usado no metabolismo em geral origina O_2^- (Clerch e Massaro, 1997). Apesar do H_2O_2 ser uma espécie bem menos reativa do que o ânion superóxido, ele pode indiretamente ser bem mais nocivo. Em primeiro lugar, esta molécula (H_2O_2) tem a capacidade de



A reação (2) pode ser dividida em três reações:

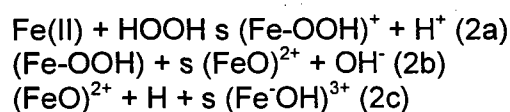


Figura 1 - Adaptado de Fridovich (1998)

se difundir por membranas lipídicas. Em segundo lugar, ela pode dar origem a radicais bastante reativos, inclusive gerando OH^\bullet , formado a partir da reação do H_2O_2 com metais de transição como Fe^{2+} e Cu^{2+} (Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1989; Clerch & Massaro, 1997), nas chamadas reações de Fenton (Figura 1). A formação deste radical também pode envolver o O_2^- , pois este pode oxidar complexos (como por exemplo enzimas como a aconitase) enzimáticos portadores de ferro (grupamentos 4Fe-4S), alterando a valência do Fe^{2+} disponibilizando-o para a reação com H_2O_2 (Fridovich, 1998). Devido à sua extrema reatividade, esses intermediários de oxigênio são capazes de promover vários danos aos diversos tecidos de um organismo (Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1989; Clerch & Massaro, 1997).

Durante nossas vidas somos expostos de forma leve, porém crônica, à todos esses danos oxidativos (Fridovich, 1998). Ainda que contemos com uma série de

sistemas de detoxificação, além de sistemas de reparos dos danos causados por elas, os organismos encontram-se em constante ameaça. Segundo Halliwell (citado em Thomas & Kaiyanaraman, 1997) o termo estresse oxidativo é freqüentemente mal definido. Costuma-se chamar de estresse oxidativo aquela situação em que ocorre um desequilíbrio “pró-oxidante/anti-oxidante”, em favor da produção de EROs levando a danos em potencial (Thomas & Kaiyanarama, 1997). O próprio termo antioxidante, apesar de muito usado, raramente é bem definido. Halliwell propôs chamar de antioxidante qualquer substância que, em doses relativamente menores do que a do substrato oxidável, neutralize ou reverta o processo oxidativo (Thomas & Kaiyanaraman, 1997). O problema é esta definição, o que sem dúvida vai depender do ensaio em questão, das fontes de oxidação e da natureza do substrato (Thomas & Kaiyanaraman, 1997).

Existem diversas formas de atingir esta situação de desequilíbrio. Uma das mais comuns decorre de deficiências no sistema de defesas antioxidantes. É bem sabido que mutações que atrapalhem o funcionamento e/ou expressão de genes para as enzimas antioxidantes (como por exemplo a CuZn-SOD, Mn-SOD e GPX) podem deixar o organismo desprotegido frente a danos oxidativos (vide Halliwell & Gutteridge, 1989; Clerch & Massaro, 1997). A presença de toxinas que porventura inibam estas enzimas é outra causa bastante importante de dano oxidativo. Outra forma é a depleção de antioxidantes não enzimáticos por exacerbação de alguma via de biotransformação de xenobióticos (por exemplo, xenobióticos biotransformados pela glutathione peroxidase). Por outro lado, pode-se provocar o estresse oxidativo simplesmente aumentando a produção de EROs. Isso pode ser causado pelo aumento da tensão de O_2 , pela presença de toxinas (ou de seus

metabólitos) que sejam elas próprias radicais livres, ou pela exacerbação da atividade de sistemas naturais produtores de EROs como o que ocorre durante processos inflamatórios (para revisão ver Thomas & Kalyanaraman, 1997). Também não se pode deixar de citar que o equilíbrio da balança fisiológica pode pender para o estresse oxidativo, caso ocorra a falência dos sistemas de reparos de danos (sejam eles ao DNA, às membranas, etc.) causados por EROs. (Thomas & Kalyanaraman, 1997).

Muitas doenças têm sido associadas ao estresse oxidativo, tornando este campo de estudo tremendamente concorrido. Perto de uma centena de doenças tem a formação de EROs associadas ao seu desenvolvimento. A lista vai desde a artrite reumatóide e choque hemorrágico, passando por cardiomiopatia e fibrose cística e chegando a isquemia gástrica e AIDS (para revisão ver Thomas & Kalyanaraman, 1997). Tal fato não deve causar espanto, pois o tema comum a todos estes processos patológicos é o dano tecidual perpetrado pelas EROs. (Halliwell & Gutteridge, 1989; Clerch & Massaro, 1997). Por exemplo, boa parte dos danos causados por radiação são promovidos pelos radicais livres. Isso pode ser constatado pela formação de derivados oxidados de DNA após exposição à radiação, além dos produtos da peroxidação de membranas resultado de uma reação em cadeia que culmina com a geração de radicais livres lipídicos. Esses danos são responsáveis pelo comprometimento e destruição das biomembranas presentes em todas as células (Clerch & Massaro, 1997). Também é uma característica do dano oxidativo a formação de fragmentos de DNA em fita simples e fita dupla. Este último tipo de dano é bastante mais sério pois não é passível de ser reparado pelas enzimas, que normalmente são eficientes para eliminar danos em fita

simples. Apesar de existirem enzimas capazes de reparar os danos de fita dupla, estas não são tão eficientes como as enzimas reparadoras de danos de fita simples. O acúmulo desses fragmentos pode exaurir as reservas de NAD^+ da célula. Uma das enzimas participantes do sistema de reparos, a poli (ADP-ribose) sintetase (PARS) que transfere ADP-ribose do NAD^+ para enzimas nucleares pode acabar por depletar as reservas desse co-fator, o que pode levar à morte celular (Clerch & Massaro, 1997).

Apesar de normalmente se ressaltar o papel negativo e deletério das EROs, é sabido que a produção dessas espécies acontece de forma fisiológica, e não apenas como um subproduto "indesejável" do metabolismo oxidativo. Cada vez é mais evidente que esta produção "basal" cumpre uma função fisiológica importante (Rakesh *et al.*, 1998; Finkel, 1998; Dalton *et al.*, 1999; Allen & Tresini, 2000). É notório que células de defesa (por exemplo, os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos) são capazes de produzir EROs que funcionam como agentes microbicidas. Essas espécies são muito efetivas na destruição de muitos tipos de patógenos, como bactérias e protozoários (para revisão ver Bogdan *et al.*, 2000). Mesmo que a produção exagerada dessas espécies durante processos infecciosos possa estar ligada à gênese de muitas doenças crônicas, ainda assim constituem um importante sistema de defesa dos organismos multicelulares. Surpreendentemente, apesar da notória toxicidade dessas espécies, os organismos unicelulares e multicelulares parecem ter aprendido não só a se protegerem de seus efeitos deletérios, mas a usá-las em suas intrincadas redes bioquímicas. Esses metabólitos tóxicos passaram de indesejáveis subprodutos para úteis estratégias de

defesa até, finalmente, tornarem-se componentes essenciais dos processos de comunicação celular dos seres vivos, o que será analisado nas seções posteriores.

1.8.2. Óxido Nítrico

Outro gás de fundamental importância na biologia é óxido nítrico (NO), descrito originalmente como um poluente ambiental, mas que no final dos anos 80 foi identificado por Richard Palmer e Salvador Moncada como sendo o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF; *endothelium-derived relaxing factor*, Palmer *et al.*, 1987), descoberto anos antes por Robert Furchgott e colaboradores (Furchgott & Zawadski, 1980). A partir daí, descobriu-se que o NO era de suma importância em uma gama enorme de processos fisiológicos e patológicos. As enzimas responsáveis pela sua síntese, que passaram a ser denominadas coletivamente de NO sintases (NOS), foram identificadas e encontradas nos mais diversos tecidos, além de serem amplamente distribuídas na escala filogenética (Franchini, Conte e Ottaviani, 1995). Atualmente, sabe-se que o NO tem participação importante na fisiologia de inúmeros seres vivos desde animais, passando por plantas, a bactérias (Radomski *et al.*, 1991; Elphick *et al.*, 1993; Conte & Ottaviani, 1995; Franchini *et al.*, 1995; Durner *et al.*, 1999).

Costuma-se classificar as isoformas de NOS em três tipos: I, II e III. O tipo I, também chamado de enzima endotelial (eNOS), tendo um papel fundamental no controle do tônus vascular e pressão arterial (Moncada *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993). O tipo II, conhecido como NOS induzida (iNOS), pode ser expressa em macrófagos, neutrófilos, condrócitos e células de músculo liso, entre outras (Moncada *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993). O NO produzido por esta isoforma enzimática tem papel principal na defesa do hospedeiro contra infecções e células

tumorais ou, em determinadas circunstâncias, na fisiopatologia do choque séptico (vide revisões Moncada, 1992; Thiermermann, 1997). Para que esta enzima seja expressa, é preciso que tais células sejam previamente estimuladas por citocinas (IFN, IL-1, etc.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS) de parede de bactérias, principalmente gram-negativas, para que o gene da iNOS seja transcrito numa proteína funcional (para revisão ver Morris e Billiar, 1994). O tipo III, a NOS neuronal (nNOS), é encontrada em neurônios do sistema nervoso periférico e central (Moncada *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993) e o NO por ela produzido parece (entre outras funções) ter um papel fundamental no fenômeno chamado de potencialização de longa duração (LTP), normalmente associado à memória (para revisão Malenka, 1994 e Dawson e Dawson, 1998). Os tipos I e III são Ca^{2+} -dependentes e o tipo II Ca^{2+} -independente. Na verdade, todas as isoformas, estritamente falando, parecem depender do Ca^{2+} . No entanto, os primeiros são ativados após a entrada de Ca^{2+} dentro da célula, ao formar-se o complexo Ca^{2+} /calmodulina, que se combina às NOS constitutivas, ativando-as (Moncada, 1992, Schmidt *et al.*, 1994). Já a iNOS, tão logo é sintetizada liga-se a uma molécula de calmodulina ligada a Ca^{2+} de uma forma muito estável, que a torna resistente à retirada de Ca^{2+} do meio (Schmidt *et al.*, 1994). Todas as NOS são ativas na forma de um homodímero, necessitando de uma série de co-fatores, como tetraidrobiopterina (THB4), mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina (FAD) e dinucleotídeo de nicotinamida fosfato reduzido (NADPH) (para revisão Mayer & Andrew, 1998). As NOS formam NO a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular (O_2) (Figura 2). A reação completa se dá com a oxidação do nitrogênio guanidínico da L-arginina, com formação do radical NO^\bullet e do aminoácido L-citrulina (vide revisão Marletta *et al.*,

1998). As isoformas da NOS possuem uma grande homologia com as enzimas da família do citocromo P450, apresentando um domínio redutase e um domínio oxigenase, responsável pela síntese do NO (para revisão ver Marletta *et al.*, 1998). As enzimas induzidas (iNOS) podem chegar a produzir quantidades até três ordens de magnitude maiores do que as produzidas pelas demais isoformas (para revisão ver Marletta *et al.*, 1998). Diferentemente das NOS constitutivas, cuja modulação de atividade é feita essencialmente pela ligação ao cálcio/calmodulina e pela ligação com outras proteínas (hsp90, caveolina, PSD-95, etc.; Brenman *et al.*, 1996; Jaffrey *et al.*, 1998), a modulação da síntese e da atividade da iNOS pode envolver diversos sistemas de transdução de sinal (Jak1/STAT1 α /IRF-1; I- κ B/NF- κ B; MAPK; PiP3K; PKC; proteína tirosina fosfatase1 e 2A).

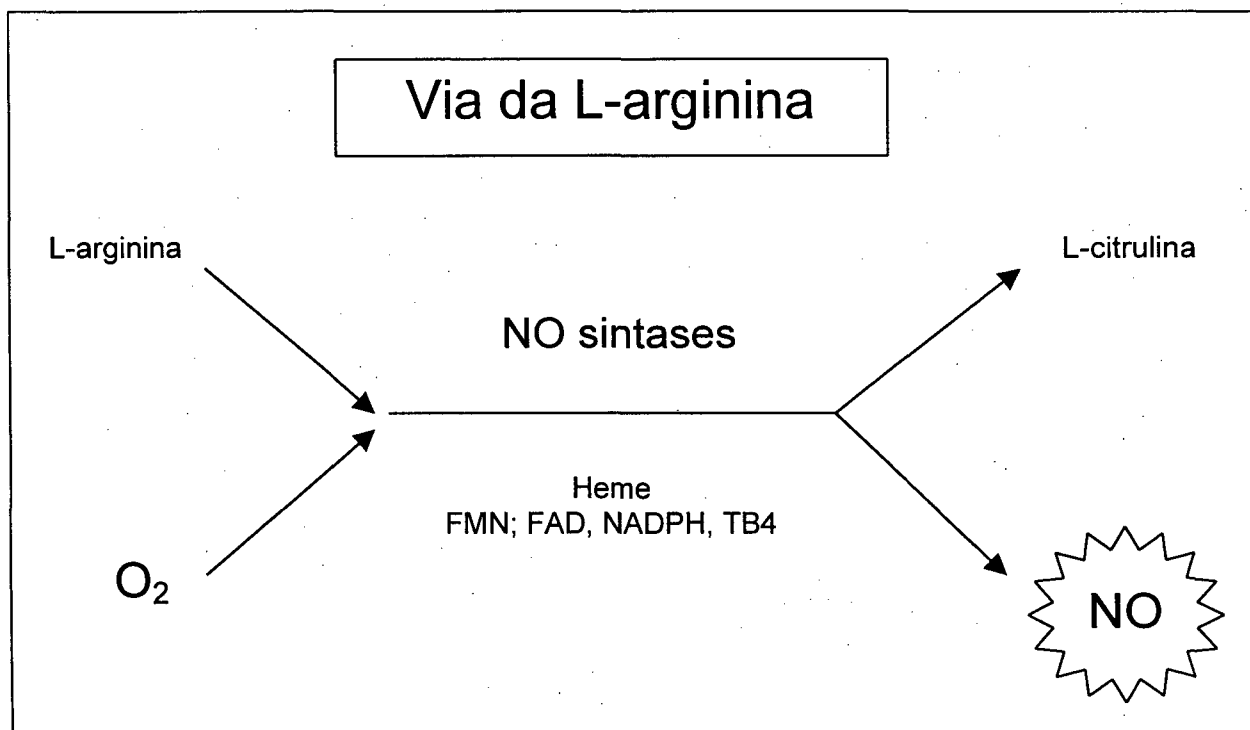


Figura 2 - Adaptado de Moncada e Higgs 1993

As várias isoformas de NOS são reguladas pela disponibilidade de L-arginina e do co-fator TBH4 necessário para a dimerização. As NOS do tipo I e II são

encontradas no citosol, associadas a proteínas do citoesqueleto. A isoforma neuronal pode associar-se a proteínas de membrana através de seu domínio PDZ (Brenman *et al.*, 1996). A eNOS (tipo III) encontra-se normalmente ancorada na membrana das células endoteliais, através de resíduos de ácido graxos (através de palmitoilação e miristoilação de certos resíduos de aminoácidos presentes na enzima) em pequenas invaginações da membrana celular, chamadas de cavéolas (para revisão ver Fleming & Busse, 1999). Também já foi reportada a presença de certas isoformas de NOS em vesículas, ou associadas às mitocôndrias (Ghafourifar & Richter, 1997). As isoformas constitutivas (tipo I e III) geralmente produzem quantidades de NO na ordem de pM a nM, diferentemente daquilo que pode ser produzido pela isoforma induzida (da ordem de μ M). Assim, as pequenas mas constantes quantidades de NO produzidas pelas isoformas neuronal e endotelial teriam um importante papel regulatório na manutenção da homeostasia. Por outro lado, as enormes quantidades de NO produzidas em curtos períodos encontradas durante as respostas imune e inflamatória teriam implicações nas atividades antimicrobiana e citotóxicas das células de defesa. Mais recentemente entretanto, esta visão vem sofrendo modificações, já que funções imunomodulatórias desempenhadas pelo NO (e seus congêneres) derivado da iNOS e por EROs vêm sendo mostradas (Bogdan *et al.*, 2000).

1.8.3. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN) e Sinalização Celular

Já há muito tempo era bem conhecido que alterações no metabolismo oxidativo interferiam com eventos de crescimento, diferenciação e desenvolvimento dos animais e plantas. A observação dos efeitos diretos e indiretos das EROs

causando alterações nas células durante processos de diferenciação, morte, envelhecimento e na gênese de tumores (Ashok & Ali, 1999; Allen & Tresini, 2000) foram interpretadas como indícios de que as células haviam desenvolvido estratégias para integrar essas espécies à sua maquinaria molecular (Allen & Tresini, 2000). A identificação de genes específicos, e vias de sinalização afetadas pela manipulação do estado de oxi-redução, levou à sugestão que as EROs teriam um papel fundamental como mensageiros intracelulares (Allen & Tresini, 2000).

1.8.3.1. ERO e ERN na sinalização

A eficiência citotóxica de EROs contra bactérias é bem conhecida. No entanto, bactérias expostas à doses subletais de agentes oxidantes, como por exemplo H_2O_2 , desenvolvem a capacidade de tolerar doses subseqüentes que são letais para bactérias controle (isto é, não expostas previamente ao H_2O_2 ; Davis & Ursini, 1995). A descoberta de dois "regulons" (grupos genes dispostos e ativados em seqüência) expressos em condições de estresse oxidativo em bactérias veio lançar luz sobre este achado. Bactérias como *Salmonella typhimurium* e a *Escherichia coli* quando estimuladas por concentrações baixas de H_2O_2 , têm a expressão de cerca de trinta proteínas aumentada. Pelo menos 9 destas proteínas têm sua expressão induzida pela ativação da proteína oxyR, que batiza o "regulon" (Davis & Ursini, 1995). Entre essas proteínas destacam-se a catalase, glutathione redutase, alquil-hidroperóxido redutase e uma proteína inespecífica de reparo ligada ao DNA (Davis & Ursini, 1995). Outro regulon é aquele ativado pela proteína SoxR, sensível à O_2^- e NO^- , presente em *E. coli*. Dentre os genes controlados por esta proteína encontram-se a SOD, glicose 6-fosfato desidrogenase, fumarase c, aconitase e a enzima reparadora de DNA, endonuclease IV (Dempsey, 1996). A

proteína oxyR é capaz de detectar e responder ao “burst” oxidativo induzido por células fagocíticas. Também existem evidências que a oxyR seja capaz de se auto-regular. Esta proteína pode ser encontrada em duas formas, oxidada e reduzida, sendo que aparentemente ambas as formas podem inibir a transcrição do gene para oxyR, embora a forma oxidada seja mais eficiente neste aspecto. A mudança do estado de oxi-redução dessa proteína parece alterar sua afinidade pelo DNA, e principalmente sua capacidade de estimular a RNA polimerase, induzindo assim a transcrição. A proteína oxy-R possui grupos tióis que podem ser os alvos das EROs. Alguns estudos mostram que nitrosotióis também seriam capazes de ativar a proteína oxyR, abrindo mais uma forma potencial de controle, provavelmente também por modificações de oxi-redução em resíduos de cisteína. Em *S. cerevisiae* também é conhecida uma proteína que responde a alterações de oxi-redução. Seu nome é HAP-1, uma hemeproteína que é ativada na presença de oxigênio, sendo responsável pela indução de genes ligados a Mn-SOD e a outras enzimas antioxidantes (Davies e Ursini, 1995). Em mamíferos, apesar da generalizada influência do estado de oxi-redução na ativação de várias vias de transdução de sinal e na transcrição de muitos genes, até hoje não foi encontrado nenhum sistema exclusivamente ligado à resposta frente a estresse oxidativo (por exemplo, que induzisse o aumento da expressão de enzimas antioxidantes e sistemas de reparo a danos causados por este estresse oxidativo.) Apesar da indução de enzimas antioxidantes em certos tecidos de mamíferos realmente existir, os mecanismos envolvidos parecem ser bem menos específicos do que ocorrem em bactérias e eucariontes unicelulares (Davis & Ursini, 1995).

1.8.3.2. ERO e ERN e fatores de transcrição

Os primeiros estudos com êxito mostrando expressão gênica influenciada pelo estresse oxidativo em mamíferos foram feitos com vias de sinalização que envolviam a ativação de proto-oncogenes. Portanto, parece que as alterações no estado de oxi-redução das células, com consequente utilização de EROs e ERNs como mensageiros intracelulares, têm uma importância significativa no controle da proliferação e morte celular (Davis & Ursini, 1995).

Alterações no estado de oxi-redução podem ativar a transcrição de genes responsáveis pela síntese do colágeno e colagenase, induzir alterações pós-transcricionais da ferritina e ativar fatores de transcrição como o Myb e EGR-1 (Allen & Tresini, 2000). Muitos proto-oncogenes têm sua transcrição induzida pelo aumento do grau de oxidação celular. Por exemplo, a exposição de células normais, ou transformadas, à luz UV provoca aumento da expressão de jun-B, jun-D, c-fos e fos-B. O fato de antioxidantes como DTT, NAC e PDTC e pró-oxidantes como H_2O_2 serem capazes de alterar a resposta de fatores de transcrição, como o AP-1 e o NF- κ B, trouxe as primeiras evidências mais consistentes da importância do estado de oxi-redução nos processos de transdução de sinal (Allen & Tresini, 2000). O H_2O_2 é freqüentemente usado como estímulo oxidante, na caracterização de genes responsivos à alterações de oxi-redução celular (Allen & Tresini, 2000). Já foi isolada uma proteína tirosina fosfatase dependente de H_2O_2 em células humanas, além do H_2O_2 ter sido descrito como mensageiro numa via de sinalização entre o núcleo e mitocôndria, em *Petunya híbrida*, e para TGF- β e PDGF em células de mamíferos (para revisão veja Allen & Tresini, 2000). Extensivas análises parecem indicar a participação do H_2O_2 na resposta de outros genes de resposta precoce, como c-jun,

c-fos e c-myc. Aparentemente a ativação desses genes envolve, em algum grau, a ativação da proteína quinase C (PKC; Allen & Tresini, 2000). É interessante ressaltar que, apesar de muitas das respostas moduladas por oxidantes revelarem-se respostas ao estresse ou a danos em geral, outras claramente não o são. Allen & Tresini (2000) em recente revisão dão-nos diversos exemplos da modulação da transcrição de genes em condições que não envolvem dano. De fato, já foi reportada a expressão de genes de reparo de DNA sem a necessidade da presença de danos de DNA. Por exemplo, a luz ultravioleta A (320-380nm), que causa pouco danos ao DNA, é capaz de induzir a expressão de genes não envolvidos com reparo de danos como ICAM, IL-10, c-jun, c-fos, heme-oxigenase, além de ser capaz de ativar a via da JNK/MAPK e aumentar as concentrações de ferritina (vide revisão Allen & Tresini, 2000). Estes e outros exemplos sugerem que a modulação das condições de oxi-redução e o uso de EROs e ERNs como mensageiros é bem mais abrangente do que poderia inicialmente se imaginar.

A expressão de genes sensíveis ao estado de oxi-redução da célula não se dá apenas em situações de oxidação. O tratamento com antioxidantes também induz ao aumento da expressão de certos genes. Alguns estudos também mostraram que as enzimas antioxidantes desempenham um papel importante na ativação de muitas vias de sinalização. De acordo com Lander, 1990 (citado por Allen & Tresini, 2000) as respostas celulares estimuladas por EROs e ERNs podem dividir-se em: i) modulação de citocinas, fatores de crescimento, ação de hormônios e secreção; ii) transporte iônico; iii) transcrição; iv) neuromodulação e v) apoptose.

1.8.3.3. Mecanismos envolvidos no controle de sinalização via EROs e ERNs.

Apesar de os mecanismos pelos quais se dão estas modulações ainda estarem em debate, a maioria dos autores concorda que pelo menos parte destes mecanismos devam envolver alterações no estado de oxidação e redução de sulfidrilas. Essas alterações podem gerar alterações conformacionais que podem resultar no aumento ou na diminuição da afinidade de um fator de transcrição pelo DNA, liberar subunidades regulatórias ou induzir a formação de complexos protéicos, todos passos comuns aos diversos mecanismos de transdução de sinal e controle da transcrição gênica.

O NO e seus congêneres (NO^\bullet , NO^+ , N_2O , N_2O_3 , ONOO^- , etc.) também referidos como espécies reativas de nitrogênio (ERN), além de poder reagir com DNA, grupamento heme e grupamentos Fe-S (característicos de grupos prostéticos de muitas enzimas), também podem interagir com sulfidrilas presentes nos resíduos do aminoácido cisteína. Mais recentemente, tem-se dado grande atenção ao processo de S-nitrosilação, em que o NO reage com grupamentos tióis, formando uma ligação covalente reversível (Gaston, 1999). Os produtos desta reação são chamados S-nitrosotióis. Uma vez que grupamentos SH^- estão presentes em virtualmente todas as proteínas e de constituírem um excelente alvo para o NO, outros ERNs, além de é claro das EROs e outros radicais livres, fazem com que o número de alvos possíveis e das conseqüências da oxi-redução destes tióis aumentem consideravelmente. O reconhecimento de que o S-nitrosilação poderia ser capaz de alterar a conformação e as características funcionais de muitas proteínas tornou inevitável associar o NO à modulação fina das respostas de enzimas, canais iônicos e outras proteínas (Stamler, 1994). A modulação de

proteínas por alterações dos resíduos de cisteína abriu uma nova frente de investigações no que se refere ao controle do sistema de sinalização intracelular. Além da nitrosilação, existe a possibilidade de que ocorra a chamada nitração dos resíduos tirosina (processo principalmente associada ao ONOO^-), inclusive gerando especulações sobre papel que teriam estas modificações durante os processos de fosforilação (Rakesh *et al.*, 1998). Muitos autores costumam incluir o NO (apesar de seu baixo poder de oxidação) e principalmente seus derivados (como o OONO^-) como espécies ativas de O_2 . Deixando questões semânticas de lado, é inegável a importância que a regulação da oxi-redução e da nitrosilação (e quiçá da nitração) desempenha na modulação das vias de sinalização celulares. A grande quantidade de revisões sobre o assunto é uma prova substancial desse fato (Primiano *et al.*, 1997; Finkel, 1998; Ginn-Pease & Whisler, 1998; Rakesh *et al.*, 1998; Dalton *et al.*, 1999; Gamaley & Klyubin, 1999; Allen & Tresini, 2000; Lavrosky *et al.*, 2000). Portanto, as três linhas originais de pesquisa (sinalização intracelular, ERNs e EROs) acabaram por convergir, revelando-nos um quadro ainda mais complicado, porém fascinante, de como se dá a complexa rede de interações que possibilita que as diversas células comuniquem-se umas com as outras.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o envolvimento do óxido nítrico (NO) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na apoptose induzida por dexametasona em timócitos de camundongo.

2.2. Objetivos específicos:

Investigar o papel do NF- κ B na apoptose induzida pela dexametasona.

Investigar o efeito do NO e do H_2O_2 no controle da ativação do NF- κ B e sua participação na apoptose induzida por dexametasona.

Estudar o efeito de agentes inibidores do NF- κ B e de agentes redutores na apoptose em timócitos de camundongos.

Avaliar o efeito da interação do NO e H_2O_2 e com a proteína quinase C (PKC) na apoptose em timócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram usados camundongos machos *Mus musculus* da cêpa Swiss-44, pesando entre 12-15 g, fornecidos pelo Biotério Central e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22-23°C), com ciclo de luz claro/escuro de 12/12 h e com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos aqui realizados estão de conformidade com as normas explicitadas na publicação *Use and care of laboratory animals*, National Institutes of Health, EUA.

3.2. Obtenção de Timócitos

Os animais eram sacrificados por deslocamento cervical, imersos em álcool 70% para esterilização por 1 minuto e, após escorrimento do excesso de líquido, colocados em decúbito dorsal no interior de uma câmara estéril de fluxo laminar. Todo o procedimento subsequente era realizado com material em condições estéreis. A cavidade torácica era aberta, o timo localizado (acima do coração na região mediastinal) e removido cuidadosamente com auxílio de uma pinça estéril. Cada timo era colocado em um poço de uma placa de cultura (multiwell) estéril de 12 poços em 2-3 ml PBS. O timo era lavado por imersão sucessiva em PBS e depois macerado delicadamente com ajuda de pinças. Após alguns minutos de maceração, o estroma do timo composto por colágeno era descartado, a suspensão de timócitos era transferida para um tubo plástico estéril de 15 ml e o volume completado para 10 ml com PBS. Uma alíquota de 20 µl da suspensão era diluída em 380 µl de líquido de Turkey (0,2%, v/v, de ácido acético em água com cristais de azul de metileno

para contraste) para contagem em câmara de Neubauer. O tubo com a suspensão era então centrifugado por 10 min à 1500 x g à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o precipitado resultante era resuspenso em meio de cultura RPMI 1640 (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES pH 7,4, 100 UI de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina) e a concentração era ajustada para aproximadamente 5×10^6 células por ml.

3.3. Protocolo Experimental

Para execução dos ensaios foram utilizadas placas de cultura (multiwell) de 96 poços, com 200 µl de suspensão de células totalizando 10^6 células por poço. Todas as adições foram feitas em volume não superior à 20 µl. Os compostos solúveis em solventes não aquosos (DMSO) foram preparados como estoques concentrados para minimizar a adição de DMSO às células que nunca foi superior à 1% (v/v). Após a adição dos compostos de interesse, a placa com as células era mantida em estufa incubadora à 37°C (5% de CO₂) durante 24 horas, ao final das quais eram processadas para determinação da viabilidade celular.

3.4. Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular era avaliada pelo método do MTT (brometo de 4,5-dimetiazol-zil-2-5-difeniltetrazólio; van de Loosdrecht *et al.*; 1991). O MTT, um sal de tetrazólio é reduzido à um derivado formazan de cor azulada pela atividade oxidativa de células funcionando portanto como um indicador da função mitocondrial e por conseguinte da viabilidade celular. Após o encerramento do período experimental de 24 h as placas eram retiradas da estufa, centrifugadas à 1000 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após isso, o sobrenadante era descartado e substituído por

100 µl de RPMI contendo MTT na concentração de 0,5 mg/ml. A placa era então incubada por 3 horas à 37°C, centrifugada novamente e todo o sobrenadante era descartado. A cada poço era adicionado um volume de 100 µl de uma solução de álcool isopropílico (contendo HCl 0,04 N). 10 min, os restos celulares eram removidos por centrifugação e o sobrenadante era transferido para outra placa. A absorbância era efetuada em leitor de placas (Ultramicroplate Reader EL808/Bio-Tek instruments, inc.) à 540 nm. Os resultados, originalmente em densidade óptica, foram expressos na forma de porcentagem de células vivas em relação aos controles, tidos como 100% de células viáveis.

3.5. Microscopia de Fluorescência

As células apoptóticas eram visualizadas utilizando-se corantes fluorescentes, o laranja de acridina (10 µg/ml em PBS), um fluorocromo permeável à membrana e o brometo de etídio (5 µg/ml em PBS), impermeável à membrana (Geng et al, 1998). Os corantes eram misturados ao mesmo volume de células (cerca de 10 µl), uma lamínula colocada por cima da suspensão e selada com esmalte de unhas. Após cerca de 10 minutos as lâminas eram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA) usando objetiva de 40x. As células viáveis exibem uma coloração verde e as apoptóticas exibem uma coloração amarela. Campos representativos foram fotografados com filme Kodak, ASA 100. As fotos foram escaneadas e as imagens tratadas com o programa PhotoEditor, Microsoft Corporation, USA.

3.6. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 4-7$ poços em cada grupo). Para a análise estatística foi utilizado a análise de variância

de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Um valor de *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.7. Materiais e Reagentes

S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP – sintetizado pelo método de Field *et al.*, 1978); Dexametasona: Decadron (fosfato de dissódico de dexametasona 4 mg/ml); ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC); ditioneitol (DTT); brometo de 4,5-dimetiazol-zil-2-5-difeniltetrazólio (MTT), H₂O₂; acetato de forbol miristato (PMA): Sigma Chemical Co., St Louis, USA; Meio de cultura, penicilina, estreptomicina, FCS: Gibco do Brasil, São Paulo; bis-indolilmaleimida (BIM): gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Marta Sampaio de Freitas, Dep. Farmacologia, UERJ.

RESULTADOS

4. Resultados

Inicialmente, procurou-se determinar a capacidade da dexametasona em causar apoptose em timócitos. Para tanto, foram rastreadas diversas concentrações de dexametasona. Na Figura 3A pode-se observar o efeito apoptótico de três concentrações de dexametasona (1, 10 e 100 nM) após incubação por 24 horas. Como pode ser observado, o efeito apoptótico da dexametasona segue um padrão de dependência da dose, sendo significativo já na primeira concentração testada. Na concentração de 1 nM observamos cerca de 30% de morte celular (70% de células viáveis), chegando a 70% na concentração de 100 nM (Figura 1A). O valor da CE50 (concentração efetiva 50%) foi da ordem de 10 nM.

Em seguida, estudamos o efeito apoptótico de um estresse nitrosativo na forma de um doador de NO, o SNAP (S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina). Como pode ser observado na Figura 3B, o SNAP também foi capaz de diminuir a viabilidade dos timócitos de forma concentração-dependente. No entanto, parece que ocorre um platô no efeito do NO já que não houve praticamente nenhuma diferença entre 300 e 1000 μ M de SNAP. Concentrações menores que 100 μ M de SNAP (dados não mostrados) não surtiram qualquer efeito perceptível se comparados aos controles. Na concentração de 100 μ M a porcentagem de células vivas decresce em média 25% em relação ao controle enquanto que na concentração de 10 μ M número de células vivas chegou a apenas 45%. A CE50 do SNAP foi da ordem de 200 μ M. É importante ressaltar que a molécula-mãe (e portanto não nitrosilada) do SNAP, o NAP, não causou nenhuma alteração na viabilidade dos timócitos quando incubado com estas células nas mesmas

concentrações e tempo do SNAP (dados não mostrados), evidenciando assim que o efeito apoptótico do SNAP pode ser inteiramente atribuído ao NO.

O efeito de um estresse oxidativo sobre a viabilidade dos timócitos foi avaliado pela incubação destas células com H_2O_2 , um agente oxidante e indutor da ativação do NF- κ B em linfócitos e outros tipos celulares (Janssen-Heininger *et al.*, 2000). Foram utilizadas as concentrações de 1, 10 e 100 μ M com as quais pode-se observar, já na concentração mais baixa, uma redução de cerca de 25% na viabilidade celular. Essa redução na porcentagem de células vivas chegou a aproximadamente 75% na concentração de 100 μ M (Figura 3C), atingindo aparentemente seu máximo, uma vez que concentrações maiores (de até 1000 μ M) não foram capazes de aumentar o índice de morte celular (dados não mostrados). A CE50 foi da ordem de 30 μ M.

A comparação das CE50 mostra que a dexametasona é portanto cerca de 20.000 vezes mais potente que o SNAP e cerca de 3.000 vezes mais potente que o peróxido de hidrogênio em causar apoptose de timócitos de camundongos.

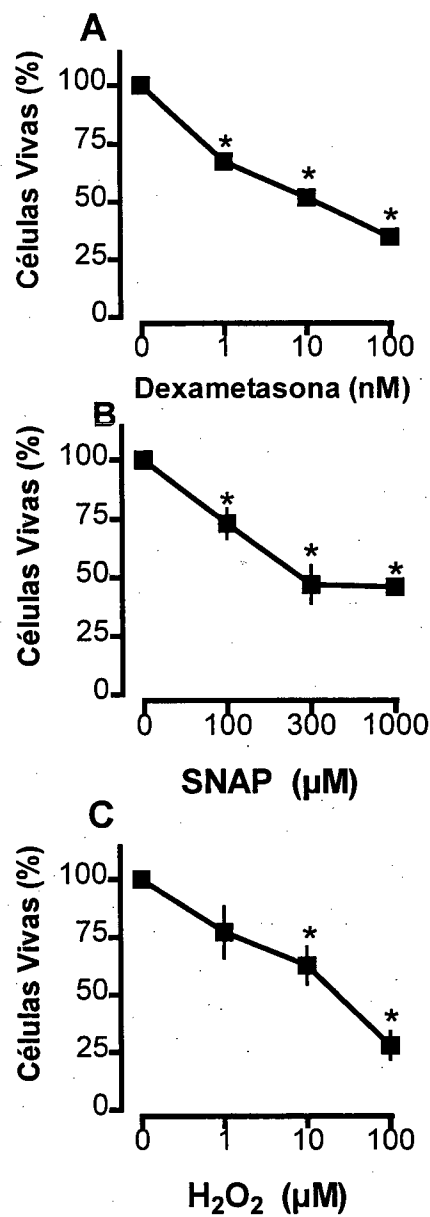


Figura 3 Efeito da dexametasona (Painel A), SNAP (Painel B) e H₂O₂ (Painel C) na viabilidade celular de timócitos de camundongo. Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média ± S.E.M. de triplicatas. P < 0.05 em relação aos grupos controle usando teste

Com o objetivo de verificar se os diversos tratamentos estavam de fato induzindo a morte celular por apoptose, timócitos incubados com todos os compostos aqui mencionados foram observados em microscópio de fluorescência para avaliação da morfologia de morte apoptótica. Como todos os compostos induziram padrão semelhante e para evitar repetições, são mostradas imagens obtidas apenas com o peróxido de hidrogênio (Figura 4). Nesta figura observa-se o claro padrão apoptótico. Na concentração de 1000 μM não aparecem mais células esverdeadas (não apoptóticas) apenas células com a característica coloração alaranjada, o que só foi observado nas preparações tratadas com H_2O_2 (dados não mostrados). O quadro apoptótico é característico com condensação nuclear, perda de seletividade da permeabilidade membranar, picnose, multilobulação nuclear, redução de tamanho celular, etc., além de ter havido uma nítida correspondência entre a concentração do composto indutor e a intensidade da apoptose.

Na literatura o efeito apoptótico da dexametasona é descrito como sendo, pelo menos parcialmente, dependente da ativação do NF- κ B (Wang *et al.*, 1999). Por outro lado, peróxido de hidrogênio e NO são apontados como ativadores deste fator de transcrição (Janssen-Heininger *et al.*, 2000 e Hsu *et al.*, 2000). Portanto, nosso próximo passo foi o de avaliar o possível envolvimento dos estresses nitrosativo e oxidativo na modulação da apoptose de timócitos por dexametasona. Para tanto, foram realizados experimentos de co-incubação de SNAP ou H_2O_2 juntamente com o glicocorticoide.

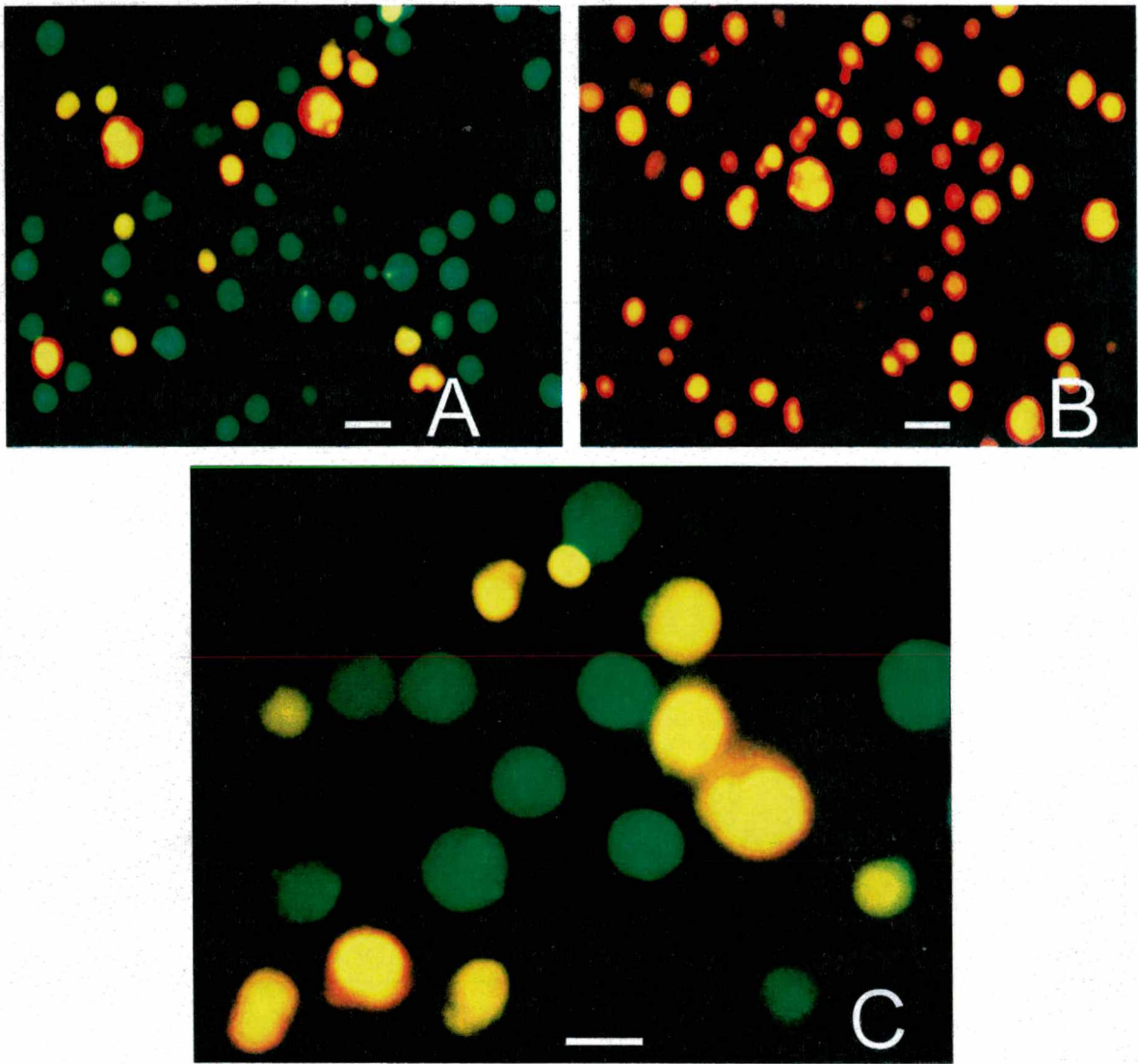


Figura 4 Alterações morfológicas em timócitos de camundongo induzidas pelo tratamento com H_2O_2 . Células controle (Painel A) ou células incubadas com H_2O_2 (100 μM ; em menor aumento Painel B ou em maior aumento, Painel C) por 24h foram processadas para microscopia de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio como descrito na sessão Material e Métodos. Campos representativos foram escolhidos. Notar a condensação de cromatina, a forma irregular dos núcleos e ocorrência de bolhas ("blebs") e o aumento da relação núcleo citoplasma, característico da apoptose. A barra nos Painéis A e B significa 20 μm (aumento de 100 x) e no Painel C 10 μm (aumento de 400 x).

A Figura 5 mostra experimentos em que duas concentrações sub-máximas de dexametasona foram testadas simultaneamente com duas concentrações de SNAP (Figura 5A) e peróxido de hidrogênio (Figura 5B). É possível observar-se na Figura 5A que o perfil de apoptose induzido pelo SNAP não parece ser afetado, nem positiva nem negativamente, pela presença simultânea de dexametasona bastando para isso comparar-se o efeito das duas concentrações de SNAP sozinhas ou co-incubadas com as concentrações de 1 e 10 nM do corticóide. Portanto parece não ter havido nenhuma alteração de um tratamento sobre o outro, apenas o efeito do SNAP tende a mascarar o efeito da dexametasona, em virtude deste último produzir uma maior morte celular. Concentrações mais baixas de SNAP (subletais) também não interferiram no perfil de morte característico da dexametasona (dados não mostrados).

Na Figura 5B observa-se o efeito do H_2O_2 sobre os timócitos tratados com dexametasona. Foram utilizadas duas concentrações de H_2O_2 (1 e 100 μM), uma praticamente incapaz de induzir a morte celular e a outra letal. Como a Figura mostra, não parece haver qualquer interferência entre os dois tratamentos, neste caso apenas a maior porcentagem de morte celular foi induzida pela concentração mais alta de H_2O_2 (100 μM). Nenhum antagonismo ou sinergismo parece estar acontecendo.

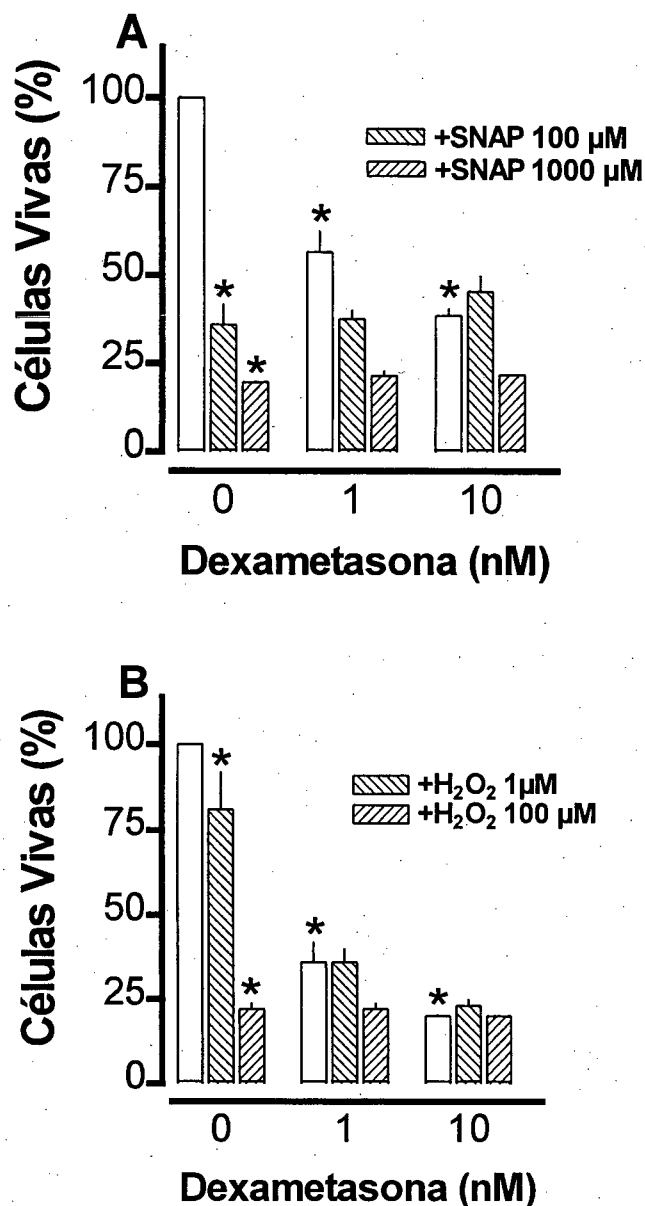


Figura 5 Efeito do NO (Painel A) e do H₂O₂ (Painel B) no efeito apoptótico da dexametasona. Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (primeira barra à esquerda) usando teste ANOVA

O próximo passo foi avaliar se o NF- κ B estaria envolvido na mediação da apoptose causada pela dexametasona. Para tanto, utilizamos um conhecido inibidor da ativação do NF- κ B, o PDTC (ditiocarbamato de pirrolidina) (SHRECK *et al.*, 1992) com o intuito de investigar a participação desse fator de transcrição no controle da morte celular induzida por glicocorticóides. Como mostra a Figura 6A, o PDTC é capaz de sozinho induzir a morte celular de timócitos após 24 horas de incubação. Em concentrações nanomolares (1-100 nM), o PDTC induziu um padrão semelhante ao provocado pela dexametasona (ver Figura 3A). A porcentagem de apoptose é de cerca de 20% na concentração de 1 nM de PDTC e de aproximadamente 60% na concentração de 100 nM de PDTC. A CE50 do PDTC situa-se na faixa de 30 nM, bastante potente portanto. Este resultado (apoptose causada por PDTC sozinho) sugere que existe uma atividade basal de NF- κ B que, se inibida, causa morte celular. Quando explorou-se a consequência da inibição da ativação do NF- κ B sobre a apoptose causada pela dexametasona, observou-se o que está mostrado na Figura 6B. A Figura 6B mostra claramente que nenhum bloqueio ou amplificação do efeito apoptótico da dexametasona pode ser observado com a co-incubação com PDTC. Ambos os compostos induzem a morte de timócitos de uma maneira dependente da concentração, alcançando seu máximo nas concentrações de 10 nM de dexametasona e de 100 nM de PDTC, exatamente como se cada uma delas estivesse agindo de forma independente. Portanto, tal resultado nos sugere que não parece haver envolvimento da ativação do NF- κ B na apoptose causada pela dexametasona, pelo menos no que tange à uma ativação redox-dependente (o tipo que é inibida pelo PDTC).

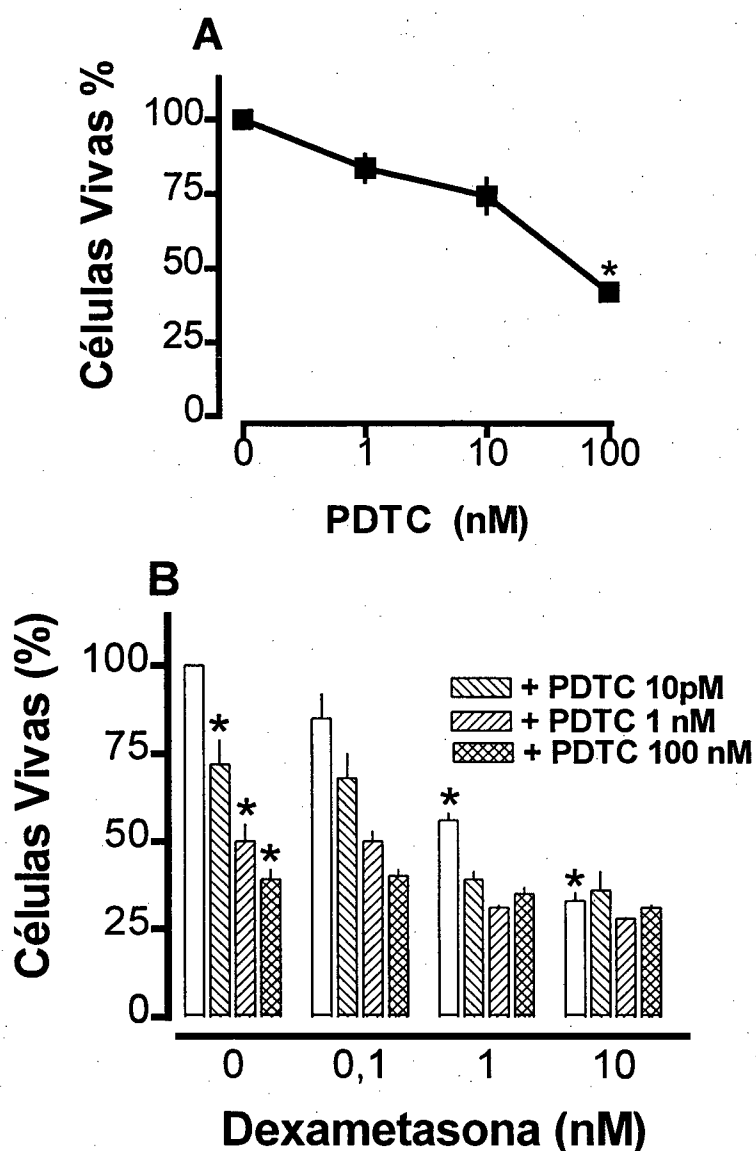


Figura 6 Efeito do PDTC sozinho (Painel A) e co-incubado com dexametasona (Painel B) Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (ponto zero, Painel A e primeira barra à esquerda, Painel B) usando teste ANOVA seguido de Bonferroni.

Uma vez que o PDTC, além de inibidor do NF- κ B, é um agente antioxidante (justificando nossa assertiva acima e sabendo-se que a ativação do NF- κ B pode ser bloqueada por antioxidantes), resolvemos testar outro agente antioxidante para verificar seu efeito sobre a apoptose induzida pela dexametasona. O composto de escolha foi o DTT (ditiotreitól) um agente redutor conhecido por sua ação antioxidante, largamente empregada para evitar-se oxidações em proteínas. Os resultados destes experimentos estão mostrados na Figura 7A. Foram testadas diversas concentrações de DTT, indo da faixa de nM (dados não mostrados) até a faixa mM. Como pode ser visto, mesmo em concentrações mM, O DTT causou apenas um pequeno decréscimo na sobrevivência celular após 24 horas de incubação sem nenhuma significância estatística, quando comparado aos controles que não sofreram nenhum tipo de tratamento. Estes resultados, até certo ponto surpreendentes, mostram que apesar de ser um antioxidante, o DTT não compartilha o efeito apoptótico do PDTC sugerindo que o mecanismo da ação antioxidante dos dois tenha importantes diferenças ou que o DTT seja incapaz de penetrar nas células.

Apesar de o DTT não ter causado apoptose quando incubado sozinho com os timócitos, decidimos verificar o que ele faria se usado em conjunção com a dexametasona. Foram utilizadas três concentrações milimolares de DTT (0,1; 1 e 10 mM), frente às mesmas doses de dexametasona usadas anteriormente. Confirmando o resultado do experimento anterior, o DTT sozinho foi incapaz de provocar apoptose nos timócitos (Figura 7B). Também, como pode-se observar pela Figura, o DTT mostrou-se incapaz de alterar, seja para mais ou para menos, o efeito apoptótico da dexametasona.

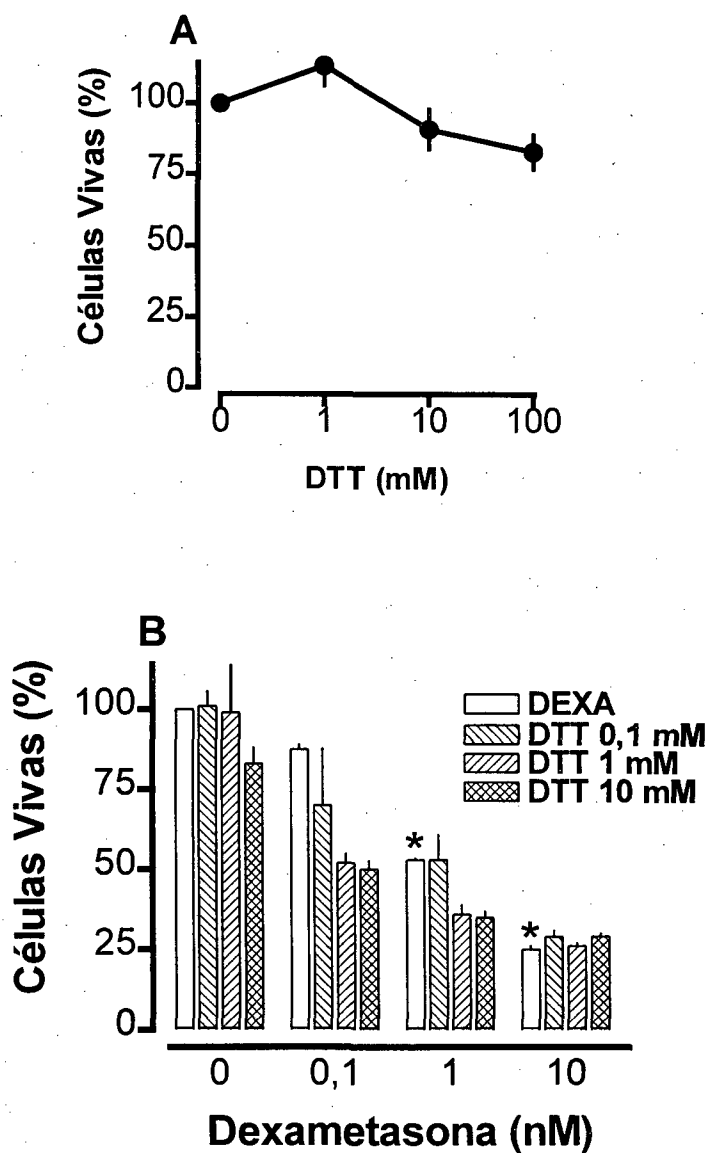


Figura 7 Efeito do DTT sozinho (Painel A) e co-incubado com dexametasona (Painel B) na viabilidade de timócitos de camundongo. Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (ponto zero, Painel A e primeira barra à esquerda, Painel B) usando teste ANOVA seguido de Bonferroni.

A participação da proteína quinase C na apoptose de timócitos foi avaliada com a utilização do composto BIM (Choi *et al.*, 2000). Quando utilizado sozinho, o BIM causou um grande efeito apoptótico mesmo em concentrações nM (1, 10 e 100 nM). A Figura 8A mostra que já na concentração de 1 nM observa-se a morte de quase 50% das células, quando comparada ao grupo controle que não sofreu nenhum tratamento. As concentrações subsequentes reduziram ainda mais o número de células vivas, para cerca de 25% na concentração de 10 nM, e para 20% na concentração de 100 nM (Figura 8A). Estes dados indicam que além da dependência de uma atividade basal de NF- κ B, timócitos de camundongo também parecem necessitar de uma atividade basal de proteína quinase C para não entrarem em programa de apoptose.

A participação desta proteína quinase no efeito da dexametasona foi investigada. As mesmas concentrações de BIM (1, 10 e 100 nM) quando co-incubadas com dexametasona forneceram os resultados mostrados na Figura 8B. Observa-se que o BIM não interferiu com a ação apoptótica da dexametasona, indicando que seja qual for o mecanismo usado pelo corticóide para causar apoptose, ele parece não envolver a ativação das várias isoformas de PKC, já que o BIM é um inibidor não seletivo destas quinases (Choi *et al.*, 2000). A título de resumo até aqui, nossos dados mostram que a dexametasona causa apoptose importante em timócitos de camundongo, que este efeito não parece depender de estresse oxidativo nem nitrosativo e não parece envolver ativação de NF- κ B nem de proteínas quinase C.

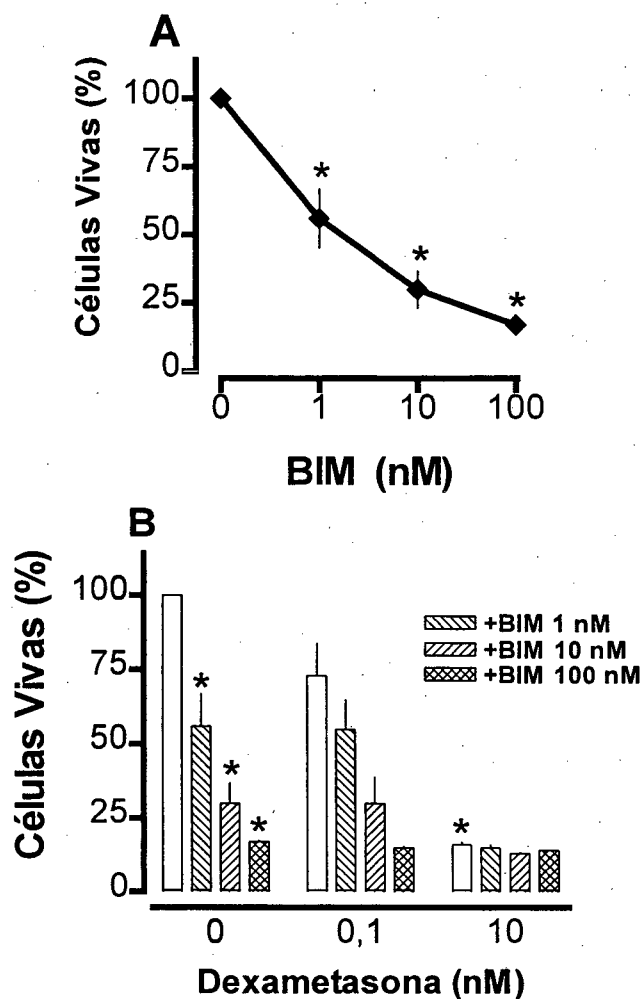


Figura 8 Efeito do BIM (bisindolmaleimida) sozinho (Painel A) e co-incubado com dexametasona (Painel B) na viabilidade de timócitos de camundongo. Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (ponto zero, Painel A e primeira barra à esquerda, Painel B) usando teste ANOVA seguido de Bonferr.

Nosso próximo passo então foi verificar como os estresses oxidativo e nitrosativo estariam causando apoptose de timócitos. Para tanto, realizamos experimentos que buscaram investigar a possível influência do H_2O_2 na morte celular induzida por SNAP. Três concentrações de SNAP (100, 300 e 1000 μM) foram co-incubadas com duas concentrações de H_2O_2 (1 e 100 μM). Observa-se que não há qualquer alteração da curva dose-resposta do SNAP quando colocado na presença do peróxido de hidrogênio (Figura 9), sugerindo que os mecanismos apoptóticos ativados por estes dois compostos parecem ser distintos, não havendo também *cross-talk* entre eles. o SNAP (nas concentrações de 100, 300 e 1000 μM) foi co-incubado com o PDTC (nas concentrações de 1, 10 e 100 nM).

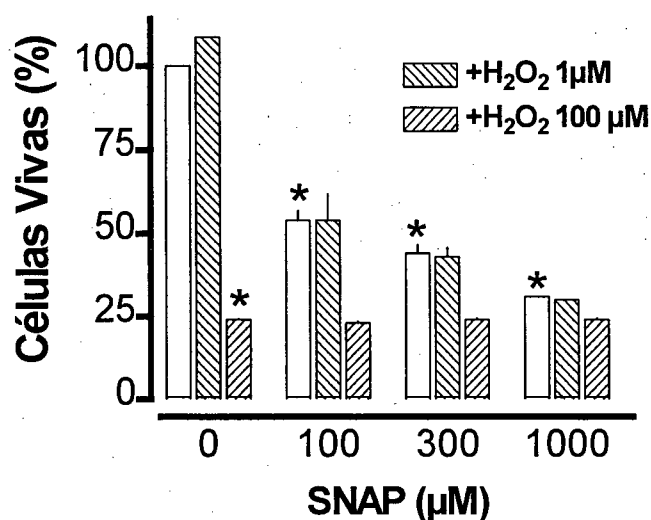


Figura 9 Efeito do H_2O_2 no efeito apoptótico do NO (na forma de SNAP). Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (primeira barra à esquerda) usando teste ANOVA seguido de Bonferroni.

A Figura 10A mostra que a curva dose-resposta do efeito apoptótico do SNAP não foi alterada pelo PDTC. Ambas os compostos induzem morte celular da mesma forma que o fariam quando administradas em separado. Portanto, a inibição da ativação do NF- κ B não muda o curso da apoptose em timócitos induzida por NO. Na Figura 10B encontram-se os resultados da influência da inibição de proteínas quinases sobre células tratadas com SNAP (10 e 100 μ M). Como pode ser observado, não houve diferenças estatisticamente significativas do BIM sobre as preparações de timócitos tratadas com SNAP. Assim, nossos resultados sugerem que a apoptose induzida por um estresse nitrosativo não parece envolver a atividade de proteínas quinase C.

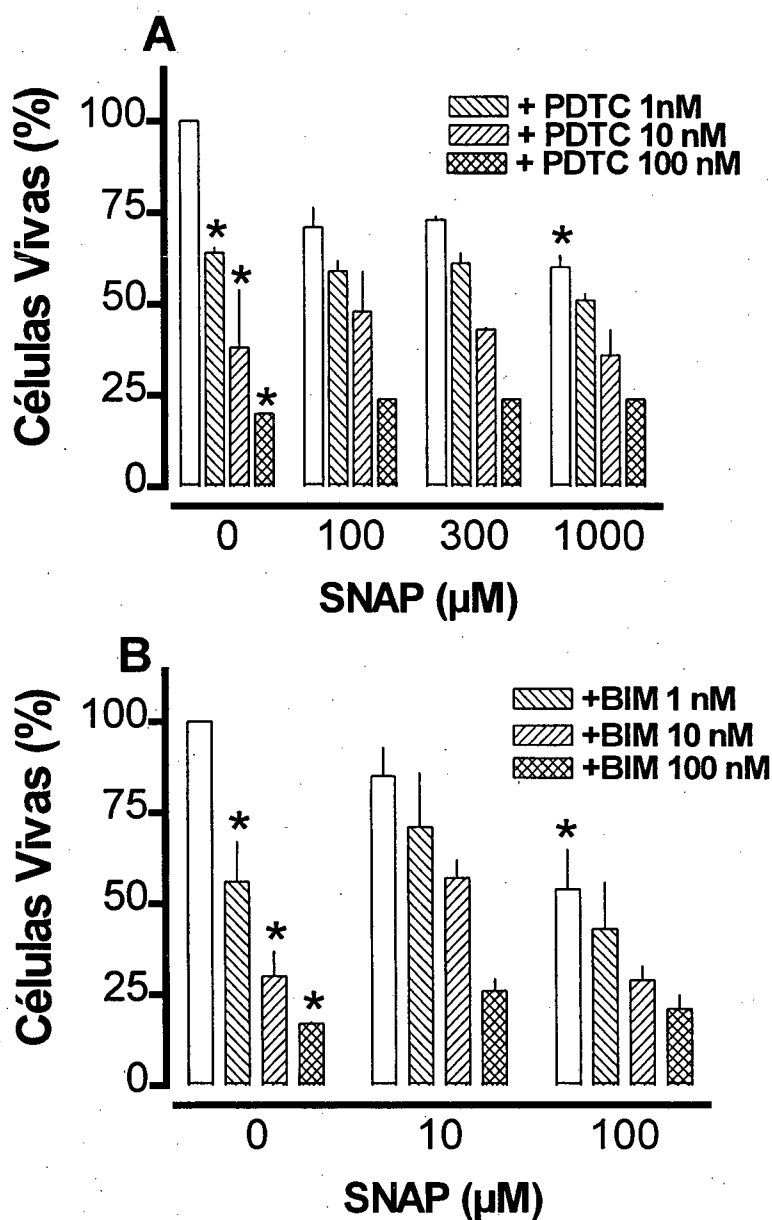


Figura 10 Efeito do PDTC (Painel A) e do BIM (Painel B) no efeito apoptótico do óxido nítrico. Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (primeira barra à esquerda) usando teste ANOVA seguido de

Os próximos passos deste trabalho foram então estudar com mais detalhe os mecanismos apoptóticos induzidos por um estresse oxidativo, neste caso pela incubação com peróxido de hidrogênio. Inicialmente, buscou-se investigar a participação do NF- κ B na morte celular induzida por H₂O₂. Foram utilizadas duas concentrações de H₂O₂ (1 e 100 μ M) co-incubadas com PDTC (Figura 11A). Como no estresse nitrosativo, o PDTC também não influenciou a apoptose causada pelo estresse oxidativo, sugerindo que o NF- κ B não esteja envolvido neste tipo de apoptose. Os resultados dos experimentos realizados para se avaliar o efeito do BIM frente ao peróxido de hidrogênio estão ilustrados na Figura 11B. Como pode ser observado, não houve diferenças estatisticamente significativas do BIM sobre as preparações de timócitos tratadas com peróxido de hidrogênio. Assim, nossos resultados sugerem que a apoptose induzida por um estresse oxidativo não parece envolver a atividade de proteínas quinase C.

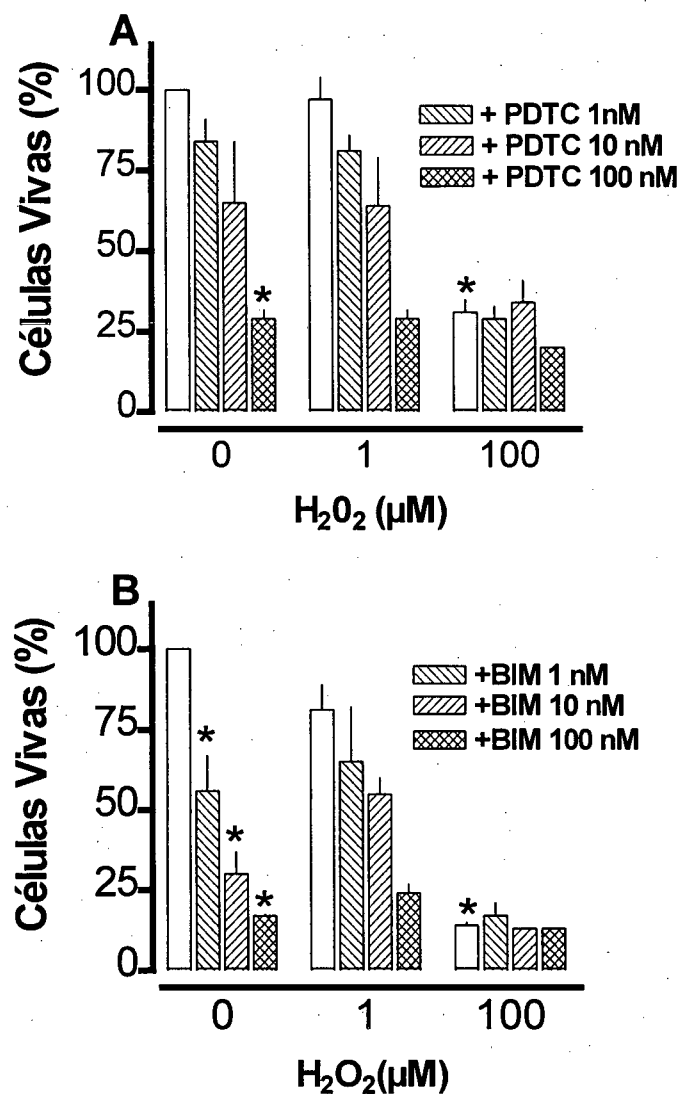


Figura 11 Efeito do PDTC (Painel A) e do BIM (Painel B) no efeito apoptótico do peróxido de hidrogênio. Os compostos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Ao final, as células foram processadas para o ensaio do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi assumida como 100% de células viáveis. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de triplicatas. $P < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento algum (primeira barra à esquerda) usando teste ANOVA seguido de Bonferroni.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Existe um substancial conjunto de evidências de que os glicocorticóides (e seus análogos sintéticos, como a dexametasona) afetam o desenvolvimento e maturação dos linfócitos T, tanto *in vivo* como *in vitro* (Ashwell, Vacchio e Galon, 2000). A indução da morte celular por apoptose em timócitos é sem dúvida a faceta mais bem estudada dessas substâncias (Thompson, 1999; Yang e Ashwell, 1999). Essas evidências vem suscitando especulações sobre um possível papel fisiológico dos glicocorticóides no desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T (Ashwell, Vacchio e Galon, 2000; Wang *et al.*, 1999; Cifone *et al.*, 1999; Yang e Ashwell, 1999). Neste caso a produção endógena de glicocorticóides, inclusive pelo próprio timo, teria um papel fundamental e desenvolvimento dos timócitos e na maturação linfócitos T imunocompetentes (Lechner, 2000; Yang e Ashwell, 1999). Portanto, os efeitos na sobrevivência dos timócitos não seriam apenas uma decorrência indesejável de altos níveis de estresse e da conseqüente produção de hormônios corticóides.

Muitas são as sugestões de como os glicocorticóides poderiam interferir no desenvolvimento normal dos timócitos (Ashwell, Vacchio e Galon, 2000). Ashwell e colaboradores (2000) propuseram que os glicocorticóides agiriam alterando a susceptibilidade dos timócitos aos sinais de sobrevivência e desenvolvimento presentes no timo. Ao agirem modulando a expressão gênica, alterariam os limiares de resposta aos diferentes sinais tornando essas células mais ou menos sensíveis a tais sinais (Vacchio *et al.*, 1999). Porém, é importante ressaltar que ainda existe bastante discussão sobre o papel dos glicocorticóides no desenvolvimento normal dos linfócitos T (Ashwell, Vacchio e Galon, 2000). Trabalhos como os de Godfrey e

colaboradores (2000) indicam que não há uma obrigatoriedade da presença de glicocorticóides para a formação do desenvolvimento das células T pois mesmo animais nocautes para o receptor de glicocorticóides ($GR^{-/-}$) não tem o desenvolvimento de células T inibido. No entanto, tais resultados não impedem que os glicocorticóides tenham um papel importante no desenvolvimento normal das células T, uma vez que parecem ser importantes para o desenvolvimento de um repertório mais variado das proteínas que compõem o complexo TCR . Existe a possibilidade de que mecanismos compensatórios poderiam estar agindo nos animais nocaute (Ashwell *et al.*, 2000). Outra questão a ser estabelecida é se os repertórios dos complexos TCR, desenvolvidos durante a maturação dos linfócitos T, são equivalentes nas duas situações ($GR^{-/-}$ e $GR^{+/+}$) (Ashwell, Vacchio e Galon, 2000). Sabe-se, no entanto, que existe uma substancial diferença entre a proporção de células duplo positivas ($CD4^{+}/CD8^{+}$) de animais nocaute e selvagens encontradas no timo (Ashwell, Vacchio e Galon, 2000), o que sugere que existam mais diferenças na imunidade desses animais em relação ao animais selvagens.

Nossos resultados iniciais corroboram o que já havia sido descrito em vários outros estudos, ou seja, a capacidade da dexametasona e outros glicocorticóides de induzir a morte de timócitos (Chmielewski *et al.*, 2000; *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). O característico perfil das células observadas na Figura 3 não deixa dúvidas de que essa morte se dê por apoptose. A condensação e fragmentação do núcleo e encolhimento do citoplasma são marcas registradas da apoptose (Hughes *et al.*, 1998) e foram observadas em todos os estímulos apoptóticos utilizados no presente trabalho. Os timócitos de camundongo parecem ser extremamente sensíveis a dexametasona. Em concentrações tão baixas quanto

0,1 nM já ocorre uma considerável diminuição da viabilidade celular. Normalmente a concentração utilizada em ensaios com ratos é da ordem de 1 μ M, ou acima disso (Rinner *et al.*, 1996). Normalmente os glicocorticóides acionam diversas vias que culminam com ativação das caspases (Hughes *et al.*, 1998). Este fato pode ser confirmado pelo utilização de inibidores de caspases que praticamente abolem a apoptose induzida por glicocorticóides (Thompson, 1999).

É inegável a participação dos receptores de glicocorticóides (GR) na indução da apoptose em timócitos. Já é bem conhecido que antagonistas dos GR impedem que as células tratadas com glicocorticóides sucumbam à apoptose (Thompson, 1999; Hughes *et al.*, 1998). Outro fato, sobre o qual não recaem questionamentos, é que as caspases são os principais executores da apoptose induzida por glicocorticóides em timócitos (Hughes *et al.*, 1998). Não obstante, ainda não são bem compreendidos muitos dos eventos por trás deste fenômeno (Ashwell *et al.*, 2000). Acredita-se que muitas via sejam ativadas durante esse processo, as quais podem variar dependendo do tipo celular e do estado de desenvolvimento (Thompson, 1999). Em trabalho recente, a própria apoptose em timócitos foi descrita como um evento dessincronizado, em que a cada dado instante apenas uma pequeno grupo de células está realmente em apoptose (Hughes *et al.*, 1998). Portanto, buscando compreender melhor alguns desses eventos tentou-se verificar o papel do NF- κ B, do NO e do estado de oxi-redução na apoptose em timócitos, na presença ou não de dexametasona.

O conhecido inibidor do fator de transcrição NF- κ B, o PDTC foi uma escolha óbvia. Apesar do mecanismo pelo qual composto bloqueia a ativação ou a atividade

do NF- κ B ainda ser motivo de debate (Ashwell *et al.*, 1999, Janssen-Heininger *et al.*, 2000), é uma ferramenta farmacológica bastante confiável.

O PDTC, bem como outros diotiocarbamatos (DTCs), são apontados com agentes antioxidantes (Nobel *et al.*, 1995; Moellering *et al.*, 1999). Alguns acreditam inclusive seja através de seu efeito antioxidante que o PDTC exerça sua ação sobre o NF- κ B (Hsu *et al.*, 2000; Janssen-Heininger *et al.*, 2000), o que é perfeitamente compreensível uma vez que o NF- κ B é um fator de transcrição sensível à alterações no estado de oxi-redução intracelular (Hsu *et al.*, 2000; Janssen-Heininger *et al.*, 2000).

Nossos resultados demonstram claramente que o próprio PDTC é capaz de induzir apoptose. Outros autores tiveram os mesmos resultados utilizando-se de concentrações maiores (10 μ M – Nobel *et al.*, 1995) e de outros modelos (Ratos - Rinner *et al.*, 1996). As concentrações utilizadas em nossos experimentos (1, 10 e 100 nM) foram as menores capazes de induzir apoptose de forma eficiente nos timócitos. Geralmente as doses utilizadas para induzirem apoptose são pelo menos dez vezes maiores do que as necessárias para bloquear o NF- κ B. Neste caso, a hipótese é de que o PDTC e outros DTCs não agiriam como antioxidantes, revelando-se ser exatamente o contrário, agentes pró-oxidantes. Portanto, a definição de antioxidante e pró-oxidante sempre depende do contexto, ou seja da concentração e do modelo em questão (Nobel *et al.*, 1995). A partir disso Nobel *et al.*, (1995) sugerem que o PDTC aja como um transportador de Cu^{2+} , carreando o Cu^{2+} presente nos meios de cultura para dentro dos timócitos. A elevação na concentração intracelular de Cu^{2+} provocaria um estresse oxidativo através das reações de Fenton. A resultante produção de várias EROs (tais como O_2^- e OH^*)

ativariam o programa de morte celular (Wolfe *et al.*, 1994; Nobel *et al.*, 1995 e Moellering *et al.*, 1999). Para verificar tal hipótese, Nobel *et al.*, (1995) utilizaram-se de quelantes de metais, BCPS (ácido dissulfônico baticuiproína) e BPS (ácido dissulfônico batofenantrolina) para bloquear os efeitos do PDTC (e de outros DTCs) na indução de apoptose. Como estes quelantes eram impermeáveis às membranas celulares, eles competiam com os DTCs pelo Cu^{2+} e o retinham do lado externo das células (Nobel *et al.*, 1995). O seqüestro do Cu^{2+} por estes agentes quelantes impediu a progressão da apoptose em timócitos. É interessante notar que as concentrações por nós usadas, tidas como incapazes de gerar um estresse oxidativo, foram bastante efetivas na morte dos timócitos. Outros estudos relatam que concentrações menores (600 nM) de PDTC confeririam uma certa proteção contra o estresse oxidativo, através do aumento da síntese de GSH (Moellering *et al.*, 1999).

Ainda mais curioso é fato de que o PDTC não ter sido capaz de reverter os efeitos da dexametasona. Trabalhos mostram que o bloqueio da atividade do NF- κ B pelo PDTC é capaz de reverter o efeito da dexametasona em timócitos, pelo menos na subpopulação $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, particularmente sensíveis à apoptose induzida por dexametasona (Wang *et al.* 1999). Mesmo em concentrações mais altas (1 e 10 μM), equivalentes às utilizadas para inibir o NF- κ B em trabalhos de outros autores, não houve qualquer efeito. Diferenças entre os modelos animais e até as linhagens poderiam explicar este fato. Ashwell e colaboradores (2000), por exemplo, levantaram a hipótese de que diferenças entre linhagens poderiam explicar achados discrepantes ligados a preparações envolvendo timócitos e glicocorticóides. Diferentes “backgrounds” genéticos poderiam compensar ou intensificar a ação de

tratamentos ou mesmo os efeitos da deleção de genes (Ashwell *et al.*, 2000; Vacchio *et al.*, 1999). Ainda mais problemáticas são as sugestões de que a inibição do NF- κ B, via PDTC, possa reverter a apoptose induzida por dexametasona. Wang e colaboradores (1999), propuseram um modelo consistente com seus achados, em que a inibição do NF- κ B estava ligada à apoptose. Seus experimentos com timócitos CD4⁺CD8⁺ sugerem que a dexametasona em preparações *ex vivo*, cause um aumento na expressão dos inibidores do NF- κ B, I κ B- α e I κ B- β (Wang *et al.*, 1999). Esse aumento de expressão acarretaria a inibição do NF- κ B e por conseguinte da proteína c-myc, controlada por ele (Wang *et al.*, 1999). Na opinião desses pesquisadores a dexametasona induziria apoptose ao interferir em uma via NF- κ B/c-myc (Wang *et al.*, 1999). Neste caso seria compreensível que tanto o PDTC como a dexametasona induzissem a apoptose, como ocorrido em nossos experimentos. Portanto, existe a possibilidade de a inibição da transcrição do NF- κ B possa ser a verdadeira responsável pela indução da apoptose. Em virtude das concentrações utilizadas estarem muito abaixo daquelas tidas como capazes de transportar Cu²⁺, pode-se especular que a apoptose encontrada em nossos resultados seja realmente causada pela inibição do NF- κ B. A sugestão de que existe uma produção basal de NF- κ B em timócitos não é nova, já tendo sido levantada anteriormente (Korner *et al.*, 1991 e Wang *et al.*, 1999).

É notório o papel do óxido nítrico como molécula sinalizadora, seja no sistema imunológico, no cardiovascular ou no nervoso (Stefano *et al.*, 1999). Sua participação na apoptose também é bem documentada (Murphy, 1999; Boscá e Hortelano, 1999; Li e Billiar, 2000; Brüne *et al.*, 1998). Portanto, o possível papel do NO na maturação de linfócitos, especialmente no tocante a apoptose, não pode ser

subestimado. Estudos demonstraram, claramente, os efeitos de vários doadores de NO na indução de apoptose (Fehsel *et al.*, 1995). Estes mesmos autores relataram que o NO era capaz de induzir apoptose em timócitos de camundongo. Todos os doadores testados foram capazes de induzir até 30% morte celular, após 8 horas de incubação, comparados com os 10% de apoptose nos controles (Fehsel *et al.*, 1995). Esta apoptose induzida por doadores de NO, podia ser prevenida pela adição de ZnSO_4 e afetava majoritariamente a subpopulação de células $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ (Fehsel *et al.*, 1995). Outra característica interessante é que a pré-incubação dessas preparações com doadores de NO por curtos períodos, era capaz de inibir a apoptose induzida por glicocorticóides (Fehsel *et al.*, 1995). Estudos *in vivo* do mesmo grupo, mostraram que a administração de endotoxina induzia uma grande apoptose no timo dos animais submetidos a esse tratamento (Fehsel *et al.*, 1995). Após 18 horas de tratamento com endotoxina havia uma grande concentração de células apoptóticas nas proximidades dos capilares sangüíneos (Fehsel *et al.*, 1995). Somando-se a isso, células dendríticas na periferia desses capilares, bem como as próprias células endoteliais dos capilares, exibiam forte marcação para a NOS induzida o que sugeriria uma participação fisiológica do NO, oriundo desta enzima, no desenvolvimento de timócitos (Fehsel *et al.*, 1995). Nossos resultados inicialmente vem confirmar parte desses achados. No entanto, apenas concentrações maiores que 50 μM de SNAP parecem surtir efeitos perceptíveis na indução de morte celular, quando comparadas aos controles. Ao contrário do relatado por Fehsel e colaboradores (1995), não foi possível observar qualquer efeito protetor do SNAP sobre a dexametasona quando ambas as drogas eram incubadas ao mesmo tempo. Mesmo com incubação prévia de 2 horas e utilização

de concentrações não letais de SNAP (1, 10, 30 e 50 μM), não observou-se qualquer efeito protetor a dexametasona (dados não mostrados). As disparidades entre os dois achados poderiam ser explicadas pelas diferenças nos modelos utilizados nos dois trabalhos. No trabalho de Feshel e colaboradores (1995) a análise da apoptose se dava pela análise *in situ* de fragmentação de DNA, 8 horas depois do tratamento. Em nosso protocolo a morte celular era avaliada 24 horas depois do início dos tratamentos, pelo método do MTT, e confirmado pela análise da morfologia e padrão de coloração das células. Tais fatos tornam a comparação entre os dois resultados um tanto difícil. Cada tipo de célula responde de forma diferente à indução de apoptose (Thompson, 1999). Normalmente, os timócitos sucumbem 24 horas depois do tratamento de glicocorticóide. Outros tipos celulares podem levar de 18 a 36 horas, além de apresentarem outras diferenças bastante marcantes (Thompson, 1999). Outro fato que deve ser levado em consideração é a assincronia da apoptose levantada por Hughes e colaboradores (1998) já que, na verdade, o que é medido é o efeito da apoptose em determinada subpopulação a cada momento. Outra diferença é que, no trabalho de Feshel e colaboradores (1995), a apoptose é expressa na forma de porcentagem de morte em relação ao número original de células comparando a porcentagem de células que sucumbiram nos grupos experimentais por apoptose induzida em relação às que morreram por apoptose espontânea nos grupos controles. Já em nosso modelo, a apoptose é expressa como a porcentagem de morte celular em relação ao controle (tido como 100%), ou seja as células que sucumbiram espontaneamente a apoptose não são incluídas. Essas diferenças talvez possam explicar a diferença nos achados. Como sugerido

previamente, diferenças de linhagens também poderiam explicar as discrepâncias entre os resultados, como no caso do PDTC e dexametasona.

Outro ponto interessante no trabalho de Fehsel e colaboradores (1995) é que, para animais tratados com endotoxina, a administração de dexametasona não intensifica a apoptose no timo. Seus resultados não mostram alterações nas percentagens de morte celular encontradas nos animais tratados com LPS, na presença ou ausência de dexametasona (Fehsel *et al.*, 1995). Este dados são perfeitamente conciliáveis com nossos próprios resultados, onde o tratamento com SNAP não aumentou a porcentagem de células mortas. Porém, Feshel e colaboradores (1995) preferem interpretar seus resultados como um indicativo do papel protetor do NO à apoptose induzida por dexametasona.

Apesar da transposição de resultados *in vivo* para *in vitro* ser sempre problemática, esses resultados também podem sugerir a existência de duas vias independentes uma modulada pelo NO e outra por glicocorticóides. Neste caso, a próxima questão seria se essa via desencadeada pelo NO seria ou não dependente do NF- κ B. Não foi encontrada evidência de que a presença do PDTC influencie a apoptose induzida pelo SNAP. Isso nos faz crer que ambas as drogas ajam por mecanismos distintos de sinalização.

O peróxido de hidrogênio também se mostrou extremamente efetivo na indução da apoptose. É perfeitamente compreensível que o H_2O_2 possa induzir a apoptose. A maioria dos sinais inflamatórios e ligados ao estresse provocam alterações na produção das espécies ativas de oxigênio, alterando o balanço de oxirredução dentro da célula (vide Bogdan *et al.*, 2000; Jansen-Heininger *et al.*, 2000; Christman *et al.*, 2000). Essas espécies podem agir como moléculas sinalizadoras

(através de mecanismos já discutidos na Introdução desta dissertação) ou de forma indireta, ao participar da produção de intermediários ainda mais tóxicos (como o OH^{\bullet}), que provocariam danos ao DNA e mitocôndrias, danos estes capazes de induzir apoptose (Kannan e Jain, 2000; Clerch e Massaro, 1997). O H_2O_2 pode simplesmente simular este processo, principalmente nas doses mais altas onde acabaria constituindo um estresse oxidativo violento. A possibilidade de que o H_2O_2 pudesse interferir com a ação da dexametasona também foi verificada. Nenhuma alteração significativa pode ser observada. Tanto nas concentrações não letais, como nas letais não observou-se qualquer influência de uma droga sobre a outra.

O fator de transcrição NF- κ B é descrito como sensível à alterações no estado de oxi-redução da célula e o peróxido de hidrogênio é freqüentemente usado como um dos estímulos para induzir sua ativação (Janssen-Heininger *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2000). No entanto, mais uma vez não pudemos obter qualquer evidência de que o H_2O_2 fosse capaz de reverter ou intensificar os efeitos do PDTC. Como não pudemos perceber qual mecanismos está realmente por trás dos efeitos do PDTC não podemos descartar uma possível associação. Se existir realmente um ativação basal constitutiva do NF- κ B, como proposto por Korner e colaboradores (1991) isso poderia significar que o equilíbrio entre a ativação do NF- κ B e sua inibição é muito mais sutil. Neste caso, ao contrário do sugerido por Wang e colaboradores (1999), a exacerbação da atividade do NF- κ B induzida por H_2O_2 seria responsável pela indução da apoptose. Esta exacerbação da atividade do NF- κ B poderia ativar outros genes, desta vez pró-apoptóticos ou simplesmente bloquear a indução de genes como c-myc ou bcl-2, por induzir a expressão de mais I- κ B, que, em uma segunda etapa, seqüestraria as moléculas de NF- κ B livres, inativando-os. Portanto, haveriam

duas formas de se modular esta via. A primeira delas pela inibição do NF- κ B, como o proposto por Wang e colaboradores (1999), para a apoptose induzida por dexametasona. A segunda forma envolveria o aumento dos níveis de NF- κ B livres provocando uma ativação maciça de genes pró-apoptóticos, ou, por um efeito rebote, aumentando a expressão do NF- κ B.

Assim como o H_2O_2 é tido como um ativador do NF- κ B o NO é freqüentemente sugerido como um modulador negativo do NF- κ B (Janssen-Heininger *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2000). A ação do NO seria levada a cabo pela nitrosilação do resíduo 62 de cisteína da subunidade p50 que precisa estar reduzida para ser capaz de “transativar” os genes alvo interferindo com sua função (Janssen-Heininger *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2000). Portanto, a possibilidade de que os dois tratamentos tivessem efeitos opostos quando aplicados conjuntamente foi testada. De novo, o efeito de cada tratamento não pareceu ser alterado pela presença do outro. Mais uma vez, os resultados deixam margem para especular sobre a possibilidade de indução de apoptose por ambos os compostos serem por vias diferentes e não sobrepostas.

Ainda com o objetivo de verificar o papel da regulação de oxi-redução na apoptose, foram feitos experimentos utilizando-se o DTT, um agente redutor com propriedades antioxidantes. O fato do DTT não ter sido capaz de causar a morte de forma significativa nos faz crer que ele não seja capaz de entrar na célula, uma vez que normalmente é usado apenas em preparações de homogenatos celulares. Nossos dados também demonstram a total incapacidade do DTT em interferir com a indução de apoptose pela dexametasona. O DTT também foi utilizado juntamente com o H_2O_2 e não surtiu qualquer efeito sobre apoptose provocada por ela (dados

não mostrados). Assim, nossa sugestão é de que o DTT não é capaz de entrar na célula, o que por um lado prejudicou a comparação da sua atividade anti-oxidante com a do PDTC mas que, por outro lado, nos confirmou que o efeito do PDTC é realmente intracelular, não podendo ser atribuído à um efeito de seqüestro de peróxido de hidrogênio ou outro ERO.

Existe um considerável conjunto de evidências de que as isoformas da proteína quinase C (PKC) estejam envolvidas no controle da apoptose (Migliorati *et al.*, 1994; Rennecke *et al.*, 2000). Durante muito tempo, acreditava-se que as PKC exerciam um efeito majoritariamente anti-apoptótico (Rennecke *et al.*, 2000). Essa conclusão era apoiada em uma série de trabalhos que demonstravam, claramente, que inibidores da PKC induziam a apoptose e ativadores dessas enzimas inibiam a apoptose (Rennecke *et al.*, 2000). Nossos resultados corroboram esta visão, ou seja, o inibidor não seletivo de PKC, BIM é capaz de induzir significativa apoptose nas preparações de timócitos após 24 horas de tratamento. Porém esta visão não parece corresponder inteiramente à verdade uma vez que outros resultados indicavam que o uso de ativadores da PKC também podiam induzir a apoptose (Rennecke *et al.*, 2000). Alguns trabalhos recentes indicam um papel para a fragmentação da PKC na indução de apoptose, inclusive sendo possível induzir a apoptose em outras linhagens celulares por transfecção dos fragmentos de determinadas isoformas de PKC (Rennecke *et al.*, 2000). No entanto em outros modelos, como em células LNCaP, não foi encontrada tal correlação (Rennecke *et al.*, 2000). Na verdade, a PKC- γ (uma das isoformas de PKC) não degradada parece ser a responsável pela mediação da apoptose (Rennecke *et al.*, 2000). Rennecke e colaboradores (2000), em trabalho recente, comentam que resultados contraditórios também ocorrem em

modelos de cultura de células primárias (Rennecke *et al.*, 2000). O tradicional modelo de apoptose em timócitos, usado no presente trabalho, não foge à regra (Rennecke *et al.*, 2000). Desde que o modelo passou a ser usado para elucidar o papel da PKC muitos grupos têm reportado resultados opostos (Rennecke *et al.*, 2000). Por exemplo, vários grupos reportaram que ésteres de forbol e outros ativadores de PKC possuíam um efeito anti-apoptótico, enquanto outros grupos chegaram a resultados opostos (Rennecke *et al.*, 2000). O problema parece estar no fato de que ativadores da PKC, como os ésteres de forbol, além de ativar a PKC provocam um “down-regulation” da mesma, através de vias proteolíticas (Rennecke *et al.*, 2000). Rennecke e colaboradores (2000) também ressaltam o fato de que a multiplicidade de isoformas da PKC é uma outra fonte de confusão. Por exemplo, a ativação de uma isoforma em particular pode induzir apoptose, enquanto outra pode acabar fazendo o contrário (Rennecke *et al.*, 2000). Outros autores relatam a existência de vias diferentes para ativação de diferentes isoformas de PKC, independentes de Ca^{2+} que precederiam a ativação da apoptose por glicocorticóides em timócitos ($\text{CD4}^+\text{CD8}^+$) por via dependente de Ca^{2+} (Asada *et al.*, 1998). As primeiras seriam responsáveis pela indução da apoptose enquanto as segundas seriam capazes de bloquear a indução da apoptose, resgatando-as de um “sinal de morte” (Asada *et al.*, 1998).

Em nossos experimentos a utilização do PMA (um éster de forbol) mostrou-se bastante difícil uma vez que mesmo em concentrações extremamente baixas (na ordem de pM), o PMA induzia uma acentuada morte celular sem nenhuma semelhança com o perfil dose-resposta geralmente encontrado quando as outras drogas eram utilizadas (dados não mostrados). Nenhuma outra droga testada (DTT,

PDTC, SNAP e H_2O_2 e BIM) foi capaz de alterar os efeitos produzidos pelo PMA. Portanto, a análise de tais experimentos foi muito prejudicada. Como então não foi possível uma comprovação direta da atividade inibitória do BIM sobre o PMA, o que seria bastante interessante, resolvemos verificar o efeito deste inibidor não seletivo de PKC. O tratamento com dexametasona não parece ter sido afetado pelo bloqueio da PKC. A longa duração da inibição sobre as PKC simultânea ao tratamento com dexametasona parece ser o evento complicador nos nossos resultados. Os ativadores da PKC, PMA (12-O-tetradecanoil-forbol-13 acetato) e briostatina-1 tem um efeito bifásico (Rennecke *et al.*, 2000). Primeiro, induzindo uma superativação da PKC com consequências anti-apoptóticas, nas primeiras 2 a 4 horas. Porém, a ativação prolongada (depois de 18 horas) acaba por intensificar a apoptose espontânea como a induzida por glicocorticóides. Como a ativação de longo prazo da PKC parece induzir uma “down-regulation” das enzimas PKC, pode acabar assemelhando-se ao efeito da inibição de longo prazo via BIM, encontrada em nossos resultados. No entanto, não pudemos determinar se, à semelhança do que é relatado por (Rennecke *et al.*, 2000), a apoptose estaria relacionada com a degradação de PKC.

Em relação ao efeito da inibição das PKC sobre os efeitos do SNAP e do peróxido de hidrogênio, nossa análise mostra que, do ponto de vista estatístico (ANOVA seguida do teste de Bonferroni) os resultados se comportam de forma muito semelhante ao encontrado no tratamento conjunto de dexametasona e BIM. Porém, nas concentrações de 10 μM de SNAP e 1 μM de H_2O_2 parece ter havido um efeito inibitório sobre a porcentagem de células mortas em relação ao controle. Apesar das barras representando as concentrações de 1, 10 e 100 nM não

mostrarem diferenças estatísticas significantes, em relação às barras de seus respectivos controles não tratados com SNAP ou H_2O_2 , é bastante tentador especular a cerca de uma possível significância biológica. Isso é ainda mais tentador quando observamos que, apesar da falta de diferença estatística entre barras com a mesma concentração de BIM, as barras correspondentes aos tratamentos de $1\mu\text{M}$ de H_2O_2 e $1000\mu\text{M}$ de SNAP não são significantemente menores que o controle, enquanto as barras não tratadas com SNAP e H_2O_2 o são. Porém, baseado na análise estatística não podemos considerar esta hipótese a menos que a repetição desses experimentos, reproduza fielmente este mesmo perfil. Neste caso, uma análise estatística suplementar talvez se fizesse apropriada. Tal resultado não seria absurdo, uma vez que a própria PKC é descrita como uma enzima sensível à modulação no estado de oxi-redução (para revisão ver Gopalakrishna e Jaken, 2000). A presença de uma série de sulfidrilas expostas em pontos chaves e outros “motivos” sensíveis a nitrosilação e oxidação, como “dedos de zinco” podem oferecer alvos ideais para esse tipo de modulação. Se esse efeito confirmar-se, principalmente em doses não letais de SNAP e H_2O_2 (mais semelhante ao que se esperaria numa produção fisiológica e localizada de EROs e ERNs), esta hipótese poderia constituir um interessante alvo para novas investigações.

Existe uma dificuldade inerente ao tentar isolar as diferentes vias responsáveis pela apoptose em timócitos de camundongos. Essa dificuldade torna-se ainda mais latente com a utilização exclusiva de técnicas farmacológicas. Há a necessidade de replicar alguns desses achados, bem como avaliar outros pontos como a participação da PKA (proteína quinase A) e utilizar outros indutores e

inibidores mais específicos da PKC. Não obstante, é fundamental que outras abordagens sejam somadas a essas iniciativas.

A sugestão da independência de algumas dessas vias (glicocorticóides, NO e H_2O_2) poderiam ser melhor endereçadas com a utilização de outras técnicas mais precisas. A utilização do ensaio de *electrophoretic mobility shifting assay* (EMSA) para o estudo da participação do NF- κ B é uma das mais urgentes necessidades. Também seria muito interessante o rastreamento, por *immunoblotting*, da expressão de genes como o c-myc, sugerido como fundamental na regulação da apoptose via NF- κ B, assim como de outros genes apontados como importantes no controle da apoptose. A utilização de inibidores da degradação proteolítica da NF- κ B, ou ainda, ferramentas mais seletivas, como anticorpos contra diferentes proteínas das famílias Rei e I- κ B, também poderiam nos ajudar a revelar com maior exatidão a importância de cada um dos fatores envolvidos neste processo.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- Todas as drogas utilizadas, com exceção do DTT, foram capazes de induzir a morte celular em preparações de timócitos de camundongos, após 24 horas de incubação.
- Pelo menos uma parte substancial da morte celular é decorrente da apoptose como revelado pela microscopia de fluorescência.
- O fato do PDTC, em doses muito baixas, ter sido capaz de induzir a apoptose em timócitos, sugere que a sobrevivência dos timócitos dependa da ativação basal de NF- κ B, como encontrado por Korner (1991) em timócitos humanos. Ainda que a possibilidade de uma toxicidade mediada por metais de transição não possa ser descartada.
- Ainda que não possamos afirmar com certeza, a incapacidade do PDTC em bloquear a indução da apoptose por dexametasona suscita a possibilidade de que esta via independa da inativação do NF- κ B, como sugerido por Wang e colaboradores (1999).
- A capacidade do SNAP e do H₂O₂ de induzir a apoptose vem ao encontro da literatura, sugerindo a importância fisiológica dessas moléculas na indução de apoptose. Portanto, fazendo-se necessário o aprofundamento das investigações a cerca desse processo.
- A incapacidade do SNAP e do H₂O₂ inibirem apoptose induzida por dexametasona, somada ao fato da apoptose provocada por essas drogas não ter sido bloqueada por PDTC (ou pelo DTT), sugere que possam existir pelo menos três vias de indução de apoptose e que estas sejam independentes e, pelo menos *in*

vitro, suficientes para induzir uma substancial morte celular. No entanto, não podemos descartar que as três vias interajam de uma forma não detectável por nosso protocolo experimental.

- A utilização do BIM, e seu sucesso em induzir apoptose, confirmam a importância da PKC para a sobrevivência das preparações de timócitos, ainda que os detalhes de como ela o faz permaneçam obscuros.
- Apesar da possível diminuição da porcentagem de células em apoptose, induzida pelo BIM, por doses não letais de H_2O_2 e SNAP, não ser significativa, é curiosa o suficiente para a repetição e aprofundamento de tais experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. AND POBER, J.S Cellular and Molecular Immunology 3rd edition W.B. Saunders 2000

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G.M.; COOPER, N.R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B.; CALEB, E.F.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W.S.T.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LIH-FEN L.; MRAK, R.; MACKENZIE, I.R.; MCGEER, P.L.M.; O'BANION, K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; VAN MUISWINKEL, F.L.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, 21: 383-421, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular Biology of the Cell, Garland Print, Inc 3rd edition New York & London, 1994.

ALLEN R.G.; TRESINI M. Oxidative stress and gene regulation **Free Radicals in Biology and Medicine**. 28: 463-99, 2000.

ASADA, A.; ZHAO, Y.; KONDOI, S.; IWATA, M. Induction of thymocyte apoptosis by Ca²⁺ - independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation. **The Journal Of Biological Chemistry**, 273: 28392-28398, 1998.

ASHOK BT, ALI R The aging paradox: free radical theory of aging **Experimental Gerontology** 343: 293-303, 1999

- ASHWELL, J.D.; LU, F.W.; VACCHIO, M.S. Glucocorticoids in T cell development and function. **Annual Review of Immunology** 18: 309-345, 2000.
- BALDWIN, A.S.; SHARP, P.A. Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2Kb class I major histocompatibility gene **Molecular Cell Biology**. 1:305-13, 1987
- BATES, T.E.; LOESCH, A.; BURNSTOCK, G.; CLARK, J.B. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 218: 40-44, 1996.
- BECK, G. E.; HABICHT, G. S. The evolution of the immune system: immunity and the invertebrates. **Scientific American**, 275: 60-63, 1996.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, 12: 64-76, 2000.
- Bosca, L.; Hortelano, S. Mechanisms of Nitric Oxide-Dependent Apoptosis: Involvement of Mitochondrial Mediators **Cellular Signaling** 11: 239-244, 1999.
- BRENNAN, J.E.; CHAO, D.S.; GEE, S.H.; MCGEE, A.W.; CRAVEN, S.E.; SANTILLANO, D.R.; WU, Z.; HUANG, F.; XIA, H.; PETERS, M.F.; FROEHNER, S.C.; BREDT, D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, 84: 757-767, 1996.
- BRIDGES, A.J. Cell signaling: signal transduction and gene transcription. **Drug Discovery Today**, 3: 443-444, 1998.
- BRUNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B.; Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.** 351: 261-272, 1998.

- BUSTAMANTE J.; BERSIER G.; ROMERO M.; BADIN R.A.; BOVERIS A. Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis **Archives of Biochemistry and Biophysics** 376: 239-247 2000
- CHMIELEWSKI, V.; DRUPT, F.; MORFIN, R. Dexamethasone-induced apoptosis of mouse thymocytes: prevention by native 7-hydroxysteroids. **Immunology and Cell Biology**, 78: 238-246, 2000.
- CHOI, B.H.; CHOI, J.S.; JEONG, S.W.; HAHN, S.J.; YOON, S.H.; JO, Y.H.; KIM, M.S. Direct block by bisindolylmaleimide of rat Kv1.5 expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Pharmacol Exp Ther.* 293: 634-40, 2000.
- CHRISTMAN, J.W.; BLACKWELL, T.S.; JUURLINK, B.H. Redox regulation of nuclear factor kappa B: therapeutic potential for attenuating inflammatory responses. *Brain Pathol.* 10: 153-162, 2000.
- CIFONE, M.G.; MIGLIORATI, G.; PARRONI, R.; MARCHETTI, C.; MILLIMAGGI, D.; SANTONI, A.; RICCARDI, C. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. **Blood**, 93: 2282-2296, 1999.
- CLERCH, L.B.; MASSARO, D.J. Oxygen, Gene expression and Cellular Function. Marcel Dekker, Inc., 1997.
- CONTE, A.; OTTAVIANI, E. Nitric oxide activity in molluscan hemocytes. **FEBS letters**, 365: 120-124, 1995.
- COTTER, T.G.; MARTIN, S.J. Techniques in Apoptosis: A users guide Portland Press 1st ed., 1996.

- DALTON TP, SHERTZER HG, PUGA A. Regulation of gene expression by reactive oxygen **Annual Review of Pharmacology Toxicology** 39: 67-101, 1999
- DAVIES, K.J.A.; URSINI, F. The oxygen paradox. Cleup University Press, 1995.
- DAWSON VL, DAWSON TM Nitric oxide in neurodegeneration. **Progress in Brain Research**, 118: 215-29 1998
- DELFINO, F.; WALKER, W.H. Hormonal regulation of the NF- κ b signaling pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 157: 1-9, 1999.
- DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon-a review. **Gene**, 79: 53-57, 1996.
- DING, H.; DEMPLE, B. In vivo kinetics of a redox-regulated transcriptional switch. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, 94: 8445-8449, 1997.
- DORIA, G.; BIOZZI, G.; MOUTON, D.; COVELLI, V. Genetic control of immune responsiveness, aging and tumor incidence. **Mechanisms of Ageing and Development**, 96: 1-13, 1997.
- DURNER, J.; GOW, A.J.; STAMLER, J.S.; GLAZEBROOK, J. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. **Proceedings of National Academy of Science - USA**, 96: 14206-14207, 1999.
- ELPHICK, M.R.; GREEN, I.C.; O'SHEA, M. Nitric oxide synthesis and action in invertebrate brain. **Brain Research**, 619: 344-346, 1993.
- FEHSEL, K.; KRONCKE, K.D.; MEYER, K.L.; HUBER, H.; WAHN, V.; KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. **Journal of Immunology**, 155: 2858-2865, 1995.
- FIELD, L.; DILTS, R. V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P. G.; CARNAHAN, G. E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and

molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite.

Journal of Chemical Society Community., 249–250, 1978.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling **Current Opinlon Cell Biology** 2: 248-53,1998

FLEMING, I.; BUSSE, R.J. NO: the primary EDRF. **Mollecular Cellular Cardiology**, 31:5-14, 1999.

FOO, S.Y.; NOLAN, G.P. NF-Kappa b to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. **Trends in Genetics** 6: 229-35, 1999.

FRANCHINI, A.; CONTE A.; OTTAVIANI, E. Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. **Advances In Neuroimmunology**, 5:463-478, 1995.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, 201: 1203-1209, 1998.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-376, 1980.

GAMALEY, I.A.; KLYUBIN, I.V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. **International Review of Citology**, 188: 203-255, 1999.

GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1411: 323-333, 1999.

GENG,Y.J.; AZUMA, T.; TANG, J.X.; HARTWIG, J.H.; MUSZYNSKI, M.; LIBBY, Q.W.P. AND KWIATKOWSKI,D.J, Caspases-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. **European Journal of Cell Biology** 77: 294-302, 1998

- GERONDAKIS, S.; GRUMONT, R.; ROURKE, I.; GROSSMANN, M. The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. **Current Opinion in Immunology**, 10: 353-359, 1998.
- GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria, **FEBS Letters**, 3: 291-296, 1997.
- GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses **Annual Review of Immunology** 16:225-60, 1998
- GINN-PEASE, M.E.; WHISLER, R.L. Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. **Free Radical in Biology and Medicine** 3: 346-61, 1998
- GODFREY DI, PURTON JF, BOYD RL, COLE TJ Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory **Immunology Today** , 21: 606-11 2000.
- GOPALAKRISHNA, R.; JAKEN, S. Protein kinase C signaling and oxidative stress.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine** 2nd ed., Oxford Press, 1989.
- HERLAAR, E.; BROWN, Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. **Molecular Medicine Today**, 5: 439-447, 1999.
- HIDALGO, E.; DING, H.; DEMPSE, B. Redox signaling transcription via iron-sulfur cluster in the SoxR transcription activator. **Trends in Biochemical Sciences**, 22: 207-210, 1997.
- HSU, T.C.; YOUNG, M.R.; CMARIK, J.; COLBURN, N.H. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. **Free Radical in Biology Medical**, 28:1338-1348, 2000.

- IMADA, K.; LEONARD, W. J. The Jak-Stat Pathway. **Molecular Immunology**, 37: 1-11, 2000.
- JAFFREY, S.R.; SNOWMAN, A.M.; ELIASSON, M.J.L.; COHE, N.A.; SNYDER, S.H. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. **Neuron**, 20: 115-124, 1998.
- JANSSEN-HEININGER, Y.M.; POYNTER, M.E.; BAEUERLE, P.A.; Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. **Free Radic. Biol. Med.**, 28:1317-1327, 2000.
- KANNAN, K.; JAIN, S.K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, 7:153-163, 2000
- KEL, A.; KEL-MARGOULIS, O.; BABENKO, V.; WINGENDER, E. Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. **Journal Molecular Biology**, 288: 353-376, 1999.
- KORNER M, TARANTINO N, DEBRE P Constitutive activation of NF- κ B in human thymocytes. **Biochemistry and Biophysics Research Communications** 181:80-6 1991
- LATCHMAN, D. S. Eukaryotic Transcription Factors. 3rd ed., Academic Press CA, 1998.
- LECHNER, O.; WIEGERS, G.J.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS A.J.; DIETRICH, H.; RECHEIS, H.; WATERMAN, M.; BOYD, R.; WICK, G. Glucocorticoid production in the murine thymus. **European Journal of Immunology**, 30: 337-346, 2000.
- LEWIN, B. Genes VI. Oxford University Press, 1997.
- LEWIS, D.F.V. Cytochrome P450: structure, function and mechanism taylor & francis Ltd., 1996.

- LI J.; BILLIAR T.R. The role of nitric oxide in apoptosis **Seminars in Perinatology** 24: 46-50 2000
- LITMAN, G.W. The evolution of the immune system: sharks and the origins of vertebrate immunity. **Scientific American** Novembre, 1996.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY S.L.; MATSUDARA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, P. **Molecular Cell Biology**. 4th ed., 2000.
- MALENKA, R.C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. **Cell**, 78: 535-538, 1994.
- MARLETTA, M. A.; HURSHMAN, A. R. & RUSCHE, K. M. Catalysys by nitric oxide synthase. **Current Opinion In Chemical Biology**, 2: 656-663, 1998.
- MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selectve inhibition. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 358:127-133, 1998.
- MEDEMA, J.P.; BORST, J. T cell signaling: a decision of life and death. **Human Immunology**, 60: 403-411, 1999.
- MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; CROCICCHIO, F.; RICCARDI, C.; NICOLETT. Modulation of spontaneous and glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis by inhibitors of protetein kinases. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, 7: 241-249, 1994.
- MILLAR, D.A.; RATCLIFFE, N.A. Invertabrates. in: TURNER, R.J. Immunolgy: A Comparative Aproach., John Wiley & Sons Ltd, 1994.
- MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator and pathophysiologic entity. **Journal Laboratory Clininical Medicine**, 120: 187-91, 1992.

- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, 329: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, 43: 109-142, 1991.
- MORRIS, S.M.JR.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**, 266: E829-E839, 1994.
- MURPHY, M. P. Nitric oxide and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1411: 401-414, 1999.
- NOBEL, C. S. I.; KIMLAND, M.; LIND, B.; ORRENIUS S. & SLATER, A. F. G. Dithiocarbamates Induce Apoptosis in Thymocytes by Raising the Intracellular Level of Redox-active Copper. **The Journal of Biological Chemistry**. 270: 26202-26208, 1995.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines and nitric oxide in immune response and stress: an evolutionary aproach. **International Review of Cytology**, 170: 79-141, 1997.
- OTTAVIANI, E.; PAEMAEN, L. R.; CADET, P.; STEFANO, G.B. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacterial agent by invertabrates immunocytes. **European Journal Of Pharmacology - Enviromental And Pharmacology Section**, 248: 319-324, 1993.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.

- PALMER, R.M.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, 153: 1251-1256, 1988.
- PATEL, R.P.; MOELLERING, D.; MURPHY-ULLRICH, J.; JO, H.; BECKMAN, J.S.; DARLEY-USMAR, V.M. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis, **Free Radical Biology & Medicine**, 28: 1780-1794, 2000.
- PRIMIANO T, SUTTER TR, KENSLER TW Redox regulation of genes that protect against carcinogens **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 118:487-97, 1997
- RADOMSKI, M.W.; MARTIN, J.F.; MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the american horseshoecrab (*Limulus polyphenus*). **Philofical Transactions of the Royal Society of London B**. 334: 129-133, 1991.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceedings of National Academy of Science U.S.A.**, 87: 10043-10047, 1990.
- RENNECKE, J.; RICHTER, K.H.; HAUSSERMANN, S.; STEMPEKA, L.; STRAND, S.; STOHR, M.; MARKS, F. Biphasic effect of protein kinase C activators on spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in primary mouse thymocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 20: 289-296, 2000.
- RINNER, I.; FELSNER P.; HOFER D.; GLOBERSON A.; SCHAUENSTEIN, K. Characterization of the spontaneous apoptosis of rat thymocytes in vitro. **International Archives of Allergy and Immunology**, 111: 230-237, 1996.

- SANDAU, K.; BRUNE, B.; The dual role of S-nitrosoglutathione (GSNO) during thymocyte apoptosis. *Cell Signal*, 8: 173-177, 1996.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, 45: 528-537, 2000.
- SCHMIDT, H. H. H.; HOFMANN, H.; OGILVIE, P.; SENNERFELDER, H. & EINBERG, R. J. Biochemistry and regulation of nitric oxide synthase in Nitric Oxide Roles in Neuronal Communication and Neurotoxicity, eds. TAKAGI, H., TODA, N., HAWKINS, R. D. **Japan Scientific Society Press** Boca Raton, London, 1994.
- SCHRECK, R.; MEIER, B.; MANNEL, D.N.; DROGE, W. AND BAUEUERLE, P.A. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells **Journal of Experimental Medicine** 175: 1181-1194, 1992
- SCOTT, J.D.; PAWSON, T. Cell communication: the inside story. **Scientific American**, Junho, 54-61, 2000.
- STAMLER, JS Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell** 78:931-6, 1994
- STEFANO, G.B.; GOUMON, Y.; BILONGER, T.V.; WELTERS, I.D.; CADET, P. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a μ opiate receptor. **Progress in Neurobiology**, 60: 513-530, 2000.
- STENNICKE, H.R.; SALVESEN, G.S. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1477: 299-306, 2000.

- STENNICKE, H.R.; SALVESEN, G.S. Properties of caspases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1387: 17-31, 1998.
- STRICKBERGER, M.W. Evolution. 2nd ed., Jones and Bartlett Publisher, 1996.
- STRYER, L. Biochemistry. W.H. Freeman and Company 4th ed., New York, 1995.
- THOMAS, C.E.; KALYANARAMAN, B. Oxygen radicals and the disease process. Harwood Academic Publishers, 1997.
- THOMPSON, E.B. Mechanisms of T-cell apoptosis induced by glucocorticoids. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 10: 353-358, 1999.
- VACCHIO, M.S. Thymus derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. **J. Immunol.** 163: 1327-1333, 1999.
- van de LOOSDRECHT A.A.; NENNIE, E., OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J. AND LANGENHUIJSE, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. **Journal of Immunology Methods** 141: 15-22, 1991
- van't HOF R.J.; HOCKING L.; WRIGHT P.K.; RALSTON S.H. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint **Rheumatology** 39:1004-1008 2000
- WANG, W.; WYKRZYKOWSKA, J.; JOHNSON, T.; SEM, R.; SEM, J. A NF-B/c-myc-dependent survival pathway is targeted by corticosteroids in immature thymocytes. **Journal of Immunology**, 162: 314-322, 1999.
- WEINBERG, R. **Uma célula renegada: como o câncer começa**. Ed. Rocco, R.J., 1999.
- WOLFE, J.T.; ROSS D.; COHEN, G.M. A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. **FEBS Letters**, 351: 45-48, 1994.

WOLPERT. L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSEL; T.; LAWRENCE AND
MEYEROWITZ, E. *Princípios de Biologia do Desenvolvimento*, Artmed, 1998

YANG, Y.; ASHWELL, J.D. Thymocyte apoptosis. **Journal of Clinical Immunology**,
19: 337-349, 1999.